

UNTERSUCHUNGEN ZUR MOLEKULAREN
EPIDEMIOLOGIE HUMANER ROTAVIREN IN BAYERN
UND ZU DEREN VERHALTEN IN DER
GEWEBEKULTUR

WOLF - MICHAEL DEUTSCHER

~~1987~~

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555209_0002

Aus dem Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und medizinische
Mikrobiologie der Universität München

Vorstand: Prof.Dr. F. Deinhardt

UNTERSUCHUNGEN ZUR MOLEKULAREN EPIDEMIOLOGIE HUMANER ROTAVIREN
IN BAYERN UND ZU DEREN VERHALTEN IN DER GEWEBEKULTUR

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolf-Michael Deutscher

aus

Reutlingen

Jahr

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Frösner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Ruckdeschel

Dekan: Prof Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.1988

Meinen Eltern

"Wissenschaft ist nie am Ziel,
aber immer auf dem Weg"

HANS PICHLER

In diesem Sinn sind die Resultate der vorliegenden Arbeit als kleine Schritte auf dem Weg zum Ziel zu betrachten und sollen der Kritik ausgesetzt sein.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	
1.1 Entdeckung der Rotaviren.....	1
1.2 Das Rotavirus und sein Genom.....	3
1.3 Atypische Rotaviren.....	4
1.4 Zusammenhang zwischen Sero- und Elektropherotyp.....	6
1.5 Epidemiologie.....	7
1.6 Klinik und Therapie.....	9
1.7 Diagnostik.....	11
1.8 Viruskultivierung.....	12
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1 Antigennachweis.....	15
2.2 RNA-Darstellung.....	15
2.2.1 RNA-Extraktion.....	15
2.2.1.1 Direktextraktion nach Theil.....	16
2.2.1.2 Direktextraktion nach Herring.....	17
2.2.2 Gelsystem.....	17
2.2.3 Färbung.....	19
2.3 Klassifikation der Elektrophoresetypen.....	19
2.4 Viruskultivierung.....	20
3. ERGEBNISSE	
3.1 Gelelektrophorese und Epidemiologie.....	23
3.2 Viruskultivierung.....	29
3.2.1. Variation der Trypsinkonzentration bei der Vorbehandlung des Inokulums.....	29
3.2.2. Vergleich zweier Inokulationsverfahren.....	31
3.2.3. Variation der Trypsinkonzentration im Erhaltungsmedium.....	33
3.2.4. Zugabe von TPB zum Erhaltungsmedium.....	36
3.2.5. Variation des Inokulationsmodus.....	39
3.2.6. Verhalten antigenpositiver Kulturisolierungen in der PAGE.....	48
3.2.7. Mikroskopische Veränderungen der Zellkulturen.....	51

4. DISKUSSION	
4.1 Gelelektrophorese und Epidemiologie.....	57
4.2 Viruskultivierung.....	61
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	70
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	72
7. DANKSAGUNG.....	92

Verwendete Abkürzungen:

AGMK:	African green monkey kidney (cells)
CMK:	Cynomolgus monkey kidney (cells)
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EDTA:	Ethylen-Dinitrilo-Tetra-Essigsäure
ELISA:	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
FCS:	Fetales Kälber Serum
HRV:	Humanes Rotavirus
IAHA:	Immunoaderence hemagglutination assay
MEM:	Eagle's minimum essential medium
NCDS:	Nebraska calf diarrhea strain
NEAA:	Nicht essentielle Aminosäuren
PAGE:	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
RER:	Rauhes endoplasmatisches Retikulum
RNA:	Ribonukleinsäure
ds-RNA:	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
TEMED:	N, N, N', N', Tetramethylethyldiamin
TPB:	Tryptose Phosphate Lösung
Tris:	Tris(hydroxy-methyl)-Amino-Methan
ZSV:	Zell-Supplement-Verfahren



1. Einleitung

1.1 Entdeckung der Rotaviren

Akute Gastroenteritiden haben zumeist eine infektiöse Ursache. Während bakteriell verursachte Durchfallerkrankungen seit Beginn dieses Jahrhunderts in zahlreichen Arbeiten belegt sind (125), konnten in verschiedenen Fällen keine Bakterien als Erreger nachgewiesen werden (59, 79). 1943 gelang es Light und Hodes mit Hilfe von bakterienfreien menschlichen Stuhlfiltraten bei Kälbern eine akute Gastroenteritis zu erzeugen (79). Heute ist bekannt, daß sich in den benutzten Filtraten Rotaviren befanden (95).

Morphologisch wurden die Rotaviren erstmals in den frühen siebziger Jahren durch elektronenmikroskopische Arbeiten von Bishop et al. (15, 16) und Flewett et al. (45) beschrieben. Zuerst noch als "orbivirus-like" (15, 96), "infantile gastroenteritis virus (orbivirus group)" (107), "reovirus-like" (42, 71) und "duovirus" (30) beschrieben, setzte sich nach und nach der von Flewett et al. (45, 48) geprägte Begriff "rotavirus" durch. 1978 auf dem Fourth International Congress for Virology werden die Rotaviren als eigenständige Gattung in der Familie der Reoviridae, zu der auch die Reo- und Orbiviren gehören, definiert (86).

Der Name "rota" ist lateinischen Ursprungs und bedeutet Rad. Damit wird das elektronenmikroskopische Erscheinungsbild dieser Viren anschaulich beschrieben, nach dem komplette Viruspartikel wie kleine Räder mit einer großen Nabe, kurzen Speichen und einer dünnen Felge aussehen (siehe Abb.1).

Die gebräuchliche Nomenklatur dieser Viren richtet sich nach dem von Rodger und Holmes (113) vorgeschlagenen Schema, das folgende Angaben zur Bestimmung eines Rotavirustypus beinhaltet:

- Wirtsspezies, von der das Virus isoliert wurde
- geographische Herkunft
- Identifikationsnummer des Virusstammes
- Serotypennummer
- Elektropherotypennummer.



Abb.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von vollständigen humanen Rotaviruspartikeln (nach Palmer et al. (103)).



Abb.2: Variable Genomprofile humaner Rotaviren mit Referenzstamm SA-11 (nach Dolan et al. (34)).

1.2 Das Rotavirus und sein Genom

Das Rotavirus ist ein nicht lipidhaltiges, mit zwei Hüllen von 60nm bzw. 67-68nm Durchmesser versehenes Virus mit einem Kern von 38nm Durchmesser (72, 103). Das Genom besteht aus elf Segmenten doppelsträngiger RNA mit einem Molekulargewicht von $0,2 \times 10^6$ bis $2,2 \times 10^6$ Dalton (138, 68). Jedes Segment beherbergt anscheinend den Code für jeweils ein virales Protein mit Molekulargewichten von 14000 bis 133000 Dalton (99). Eines dieser Proteine ist die für die Replikation verantwortliche RNA-abhängige RNA-Polymerase, die durch Wärmebehandlung, monovalente Salze und EDTA aktiviert werden kann (65, 29). Diese Polymerase benötigt zur Herstellung intakter RNA zweiwertige Kationen und alle vier Nukleotidphosphatbausteine (129).

Das Rotavirusgenom wird erstmals von Rodger et al. (112) durch eine Gelelektrophorese in seinen elf Segmenten dargestellt. Anhand der Molekülgrösse teilt Kalica et al. (67) diese Segmente in vier Gruppen ein, beginnend mit den schweren, in der PAGE langsam wandernden Segmenten. Die erste Gruppe beinhaltet die Segmente 1 bis 4, die zweite die Segmente 5 und 6, die dritte die Segmente 7 bis 9 und die vierte die Segmente 10 und 11. Den letzten beiden Segmenten kommt in der PAGE eine besondere Bedeutung zu. Wie sich bei späteren Untersuchungen zeigte, muß zwischen einem langen -sprich schnellen- und einem kurzen -sprich langsamen- Migrationsverhalten unterschieden werden (36). Espejo et al. (36) bezeichnete Genomtypen mit kurzem Migrationsverhalten als "short types", analog solche mit langem als "long types". Innerhalb der Gruppen I bis III können auch Migrationsunterschiede der einzelnen Segmente im Verhältnis zueinander beobachtet werden. (Siehe Abb.2). Lourenco et al. (80) entwickelt ein Schema mit kleinen lateinischen Buchstaben, das wegen seiner Einfachheit auch in dieser Arbeit angewendet wird. (Siehe Abb.7). Durch diese Eigenart des Rotavirusgenoms ist die große Typenvielfalt verständlich, die bisher in vielen epidemiologischen Studien aufgezeigt wurde. So findet Lourenco et al. (80) unter 110 Isolaten 29 verschiedene Genomprofile. In Arbeiten neueren Datums finden Nicolas et al.

(101) unter 500 Proben 33 verschiedene Genomtypen, Spencer et al. (130) 32 unter 146 Isolaten.

Die Bedeutung gelelektrophoretischer Differenzierung wird besonders durch die Arbeit von Rodriguez et al. (116) ersichtlich, der bei einer scheinbar einheitlichen Epidemie in 22 untersuchten Stuhlproben zehn verschiedene Genomprofile unterscheiden kann und somit mehrere Infektionsquellen aufdeckt.

1.3 Atypische Rotaviren

Gerade durch die Gelelektrophorese ist es in letzter Zeit gelungen bis dahin nicht bekannte Genomprofile von tierischen und humanen Rotaviren zu entdecken. Rodger et al. (115) beschreibt 1982 die Isolierung eines Partikels, das elektronenmikroskopisch nicht von typischen Rotaviruspartikeln zu unterscheiden ist. In der PAGE zeigte das Genom ein atypisches Migrationsverhalten. Später berichten Nicolas et al. (101, 100), Dimitrov et al. (33) und Espejo et al. (40) über die Existenz von Rotavirus ähnlichen Viren, die 11 Segmente doppelsträngiger RNA besitzen und von ihren Autoren als "Pararotaviren" bezeichnet werden. Das Hauptunterscheidungsmerkmal dieser Pararotaviren ist das Anschließen des Genomsegmentes 7 zur Gruppe II, die damit die Segmente 5,6,7 umfaßt, während die bei typischen Rotaviren die Segmente 7,8,9 beinhaltende Gruppe III bei diesen Viren nur noch zwei Segmente, nämlich 8 und 9 besitzt. Auch die Gruppe I ist verändert, da sich entgegen der bekannten Aufteilung die Segmente 1,2 und 3,4 in zwei Douplets umgruppieren. (Siehe Abb.3). Elektronenmikroskopisch sind diese neu entdeckten Viren nicht von den bereits bekannten zu unterscheiden (40, 100, 115), dagegen ist die Dichte im CsCl-Gradienten gering erhöht (40). Serologisch besteht keine antigenetische Kreuzreaktivität zu typischen Rotaviren, weshalb sich diese neuen Rotaviren nicht im ELISA nachweisen lassen (40, 115, 100, 33, 105).

Auch in China wurden kürzlich sowohl in ihrem Genomprofil, als auch in ihrem klinischen Erscheinungsbild von den typischen und den Pararotaviren abweichende als "novel rotavirus" bzw. "Adult

diarrhea rotavirus" bezeichnete Viren isoliert (66). In dem Genom dieser Viren, das elf Segmente doppelsträngiger RNA besitzt, verschieben sich die Segmente 7 in Richtung der Gruppe II und 9 in Richtung der Gruppe IV. Die Segmente 3/4 und 5/6 bilden im Gegensatz zu bekannten Rotavirusgenomen zwei Douplets. Interessanterweise zeigten die Genomprofile dieser bei zwei großen Epidemien entdeckten Viren keine Migrationsunterschiede untereinander, sondern hatten alle ein einheitliches Elektrophoresemuster. (Siehe Abb.4).

PaR R



Abb.4: Genompattern atypischer Rotaviren (ARDV) (A) und typischer Rotaviren (B) (nach Hung et al. (66)).

Abb.3: Genom eines humanen Pararotavirus (PAR) im Vergleich zu einem typischen Rotavirusgenom (R) (nach Nicolas et al. (100)).



Über ein ähnliches aber nicht identisches "rotavirus-like agent", das sowohl Kinder wie auch Erwachsene befiel, wurde in einer Arbeit aus Boston/USA berichtet (35).

Atypische Rotaviren wurden ebenfalls bei Hühnern, Schweinen und Kühen beschrieben (93, 22, 18, 127).

Pedley et al. (105), der vergleichende Untersuchungen zur Genom und Antigenanalyse unternahm, kam zu dem Schluß, daß sich die Rotaviren in drei antigenetisch und gelelektrophoretisch deutlich unterscheidbare Untergruppen aufteilen lassen. Das antigenetische Verhalten dieser drei Untergruppen zeigt dabei keine Kreuzreaktivität. So bezeichnet er die typischen Rotaviren als Gruppe A; die Pararotaviren als Gruppe C. Viren, wie von Hung et al. (66) und Eiden et al. (35) beschrieben, sind der Gruppe B zuzurechnen. Diese Einteilung wird von Snodgras et al. (127) in einer späteren Arbeit bestätigt; zugleich weist dieser auf die mögliche Existenz einer vierten serologisch und elektrophoretisch verschiedenen Untergruppe hin.

1.4 Zusammenhang zwischen Sero- und Elektropherotyp

Kalica et al. (69) konnte durch einen ELISA und einen IAHA serologisch zwei Subgruppen unterscheiden, die sich durch ein Antigen auf der inneren Hülle differenzieren. Greenberg et al. (57) konnte diese Subgruppenunterscheidung durch Verwendung monoklonaler Antikörper bestätigen. Da aber Espejo, wie oben beschrieben, zwischen einem langen und einem kurzen Migrationsverhalten der Segmente 10 und 11 in der PAGE unterscheidet, läßt dies die Frage aufkommen welche Zusammenhänge zwischen Sero- und Elektropherotyp bestehen. Nach Untersuchungen von Kalica et al. (70), Rodger et al. (114) und Kutzusawa et al. (76) entspricht dem langen Migrationsverhalten der Segmente 10 und 11 serologisch die Subgruppe 2, dem kurzen serologisch die Subgruppe 1. Da die serologische Typendifferenzierung nach Untersuchungen von Kalica et al. (69) auf genetischen Unterschieden des Segmentes 6 in der PAGE beruht, die Migrationsunterschiede der "short" und "long" Typen die Banden 10 und 11 betreffen, sind weitere Zusammenhänge

bislang ungeklärt.

1.5 Epidemiologie

Durch Rotaviren verursachte Gastroenteritiden betreffen in der Regel Kleinkinder zwischen dem vierten Lebensmonat und dem dritten Lebensjahr (73). Jedoch konnten auch in Stühlen von Neugeborenen Rotaviren nachgewiesen werden. Meist verläuft die Krankheit in dieser Gruppe asymptomatisch oder mit nur geringen Durchfallerscheinungen (10, 106). Infektionen von jungen und im mittleren Lebensalter befindlichen Erwachsenen sind möglich und zeigen serologisch häufig eine Reaktion, jedoch meist keine Krankheitserscheinungen (74). Dagegen werden von älteren Menschen (>60 Jahre) symptomatische Infektionen, die zum Teil schwer verlaufen können, beschrieben (18). Neulich wurde von zwei Epidemien in China durch ein atypisches Rotavirus berichtet, welches bei Kindern und Erwachsenen gleichermaßen zu Durchfall, begleitet von Übelkeit und Erbrechen, führte (66). Zur Unterscheidung von typischen Rotaviren schlagen die Autoren die Bezeichnung "Adult diarrheal rotavirus" vor.

Da Rotaviren in großen Mengen im Stuhl Erkrankter ausgeschieden werden, ist nach allgemeiner Auffassung die fäkal-orale Übertragung der übliche Infektionsmodus (47). Jedoch wird von verschiedenen Autoren die Meinung vertreten, daß Rotaviren auch aerogen, d.h. über den oberen Respirationstrakt aufgenommen werden können (77). Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, daß Kinder mit Rotavirusinfektionen häufig begleitende Symptomatik von Seiten des Respirationstraktes, wie z.B. Husten und Schnupfen, haben (53). Diese Erkenntnisse konnten durch Yolken und Murphy (148) bestätigt werden, die bei fünf Kindern mit Beschwerden von Seiten des oberen Respirationstraktes Rotaviren im Stuhl fanden. Bei zweien dieser Kinder wurden auch im Trachealsekret Rotavirusantigen nachgewiesen.

Ein weiterer Aspekt der Rotavirusepidemiologie ist die in den gemäßigten Klimazonen saisonal unterschiedliche Infektionshäufigkeit, deren Gipfel in den Winter und beginnenden Frühjahrsmonaten

liegt (siehe Abb.5) (18, 73). In tropischen Gebieten dagegen verteilt sich die Infektionshäufigkeit relativ gleichmäßig über das ganze Jahr mit einem geringen Anstieg in den kühleren Jahreszeiten (128, 135).

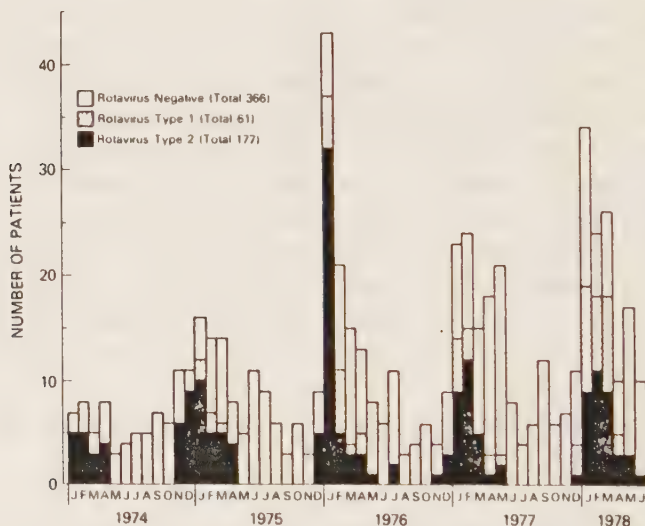


Abb.5: Saisonale Häufigkeitsverteilung rotaviral bedingter Gastroenteritiden (nach Brandt et al. (19)).

Ein anderes auffälliges Merkmal ist, daß die Durchseuchung sowohl in den Entwicklungsländern als auch in den Industrienationen nahezu gleich hoch ist. So zeigen nach einer Studie von Kapikian et al. (73) ca. 90% aller Kinder in Washington D.C. eine seropositive Antwort auf Rotaviren bis sie das fünfte Lebensjahr erreicht haben. Diese Zahl unterscheidet sich nicht signifikant von Daten von Kindern, die in Bangladesh oder Zentralamerika aufgewachsen sind. Somit sind Rotaviren in diesem Klientel eine der Hauptursachen infektiöser Durchfallerkrankungen, womit der Entwicklung von Impfstoffen, in Hinblick auf die zum Teil lebens-

bedrohlichen Verläufe der Diarrhoe, große Bedeutung zukommt. Erste erfolgversprechende Versuche hinsichtlich möglicher Kandidaten für eine Vaccine wurden bereits von Vesikari et al. (141) in einer Impfstudie, die Kleinkinder und Erwachsene einschloß, mit oral zugeführten zellkulturadaptierten bovinen Rotaviren unternommen.

Jedoch geht mit der möglichen Entwicklung eines Impfstoffes die Problematik ständiger Änderung des Antigenitätsverhaltens ähnlich wie bei Influenzaviren einher. Denn durch das segmentierte doppelsträngige Genom und mögliche Doppelinfektionen ein und desselben Individuums sind Rekombinationen und damit die Bildung antigenetisch neuer Viren denkbar. So wurden bereits erfolgreiche Rekombinationsversuche in vitro unternommen. Matsuno et al. (84) konnte eine Rekombinante aus Affen- und Rinderrotastämmen züchten. Greenberg et al. (55, 56) und Kalica et al. (69) gelang die Rekombination von bovinen und humanen Rotaviren. Die erfolgreiche Rekombination zellkulturadaptierter humaner L- und S-Rotaviren glückte 1984 Garbarg-Chenon et al. (51). Auch die Theorie möglicher Doppelinfektionen ein und derselben Person durch verschiedene Rotaviren ist inzwischen durch Berichte von Rodriguez et al. (116), Spencer et al. (131) und Houly et al. (64) sehr wahrscheinlich, da diese Autoren bei mehreren Personen Genome mit mehr als elf Segmenten nachweisen konnten, wodurch eine Doppelinfektion von Rotaviren mit unterschiedlichen Genomprofilen glaubhaft erscheint. Trotzdem scheint die Anzahl symptomatischer Infektionen während der ersten Lebensjahre auf zwei bis drei Episoden beschränkt zu sein (17).

1.6 Klinik und Therapie

Die klinischen Symptome der durch Rotaviren verursachten Gastroenteritis sind Durchfall, Erbrechen und niedriges Fieber bis 38,5°C (149). Bei Infektionen von Kindern, die drei Jahre oder älter sind werden auch begleitende Myalgien und Kopfschmerz (Reye-Syndrom) beschrieben (119). Andere Autoren berichten über Korrelationen zum Kawasaki-Syndrom (88), zum Exanthema subitum

(118) und zum plötzlichen Kindstod (148). Bei einem Kind, das nach einer Diarrhoe einen hepatischen Abzess entwickelte, konnten in dem Punktat rotavirusähnliche Partikel nachgewiesen werden (58).

Die Inkubationszeit beträgt ein bis drei Tage (149). Die Ausscheidung des Virus erfolgt während der Durchfallperiode bzw. bis zu vier Tage nach Sistieren der Diarrhoe. Die Dauer des Durchfalles kann sich von zwei bis zu 23 Tagen erstrecken (149). Die Folgen der Erkrankung sind Dehydratation sowie eine sich durch den Elektrolytverlust entwickelnde metabolische Azidose, die teilweise durch Hyperventilation kompensiert wird.

Die Entstehung des Durchfalles beruht hauptsächlich auf dem Verlust der normalen Dünndarmmucosa und ihrer Enzymausstattung, die durch Zellen mit vermindertem Gehalt an Dissaccharidasen und Lactasen regeneriert werden. Durch diese minderfunktionellen Ersatzepithelien entsteht ein befristetes Maldigestionssyndrom mit konsekutiver osmotischer Diarrhoe (31, 32).

Therapeutisch steht der Ersatz des verminderten intravasalen Volumens im Vordergrund. Dazu werden hauptsächlich orale Substitutionslösungen verwendet. Ist diese Behandlungsmethode bei ausgeprägten Krankheitsfällen durch die Häufigkeit des Erbrechens limitiert, wird auf eine adäquate parenterale Infusionstherapie übergegangen. Die metabolische Azidose wird durch geringe Gaben an Bikarbonat ausgeglichen. Bei persistierendem Erbrechen können zusätzlich noch Antiemetika gegeben werden, jedoch sollten Medikamente, die die Darmmotilität hemmen, wie z.B. Opiate, keine Verwendung finden (108).

Als Nebenaspekt sei noch erwähnt, daß Kinder mit insuffizientem Immunsystem, sei es angeboren oder sekundär als Folge immunsuppressiver Behandlung entstanden, besonders anfällig für Rotavirusinfektionen sind. So wird von Kindern mit Hypogammaglobulinämie, schweren Immundefizienzen oder aplastischer Anämie über chronische Verläufe von Rotavirus verursachtem Durchfall berichtet, der länger als sechs Monate andauern kann (123). Wurden zweien dieser Kinder passive Antikörper der IgA-Klasse in Form von Muttermilch gegeben, zeigte sich eine Senkung der Durch-

fallquote und eine verminderte Virusausscheidung. (Siehe Abb.6).

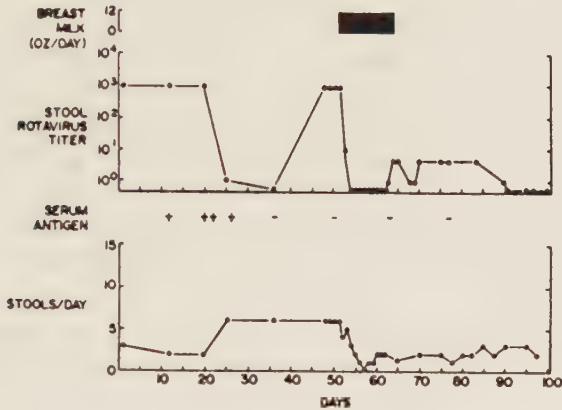


Abb.6: Protektiver Einfluß passiv zugeführter IgA Antikörper bei immuninsuffizienten Kindern (nach Saulsbury et al. (123)).

1.7 Diagnostik

Für die Diagnose einer Rotavirusgastroenteritis wurden seit ihrer Entdeckung verschiedene Verfahren verwendet, an deren Beginn das Elektronenmikroskop stand. Da diese technisch aufwendige und kostspielige Apperatur nur wenigen Zentren vorbehalten ist, wurden andere Nachweismethoden wie z.B. Immunfluoreszenz und ELISAs entwickelt. Für die klinische Routinediagnostik werden heute wegen ihrer einfachen Handhabung ELISAs angewendet, um die durch Rotaviren bedingten Gastroenteritiden von den durch andere virale, bakterielle oder allergisch verursachten Durchfallerkrankungen zu differenzieren. Morinet et al. (97) vergleicht in seiner Arbeit sechs gängige Verfahren zur Rotavirusdiagnostik aus Stuhlproben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. In der Bewertungsskala von eins bis drei bedeutet drei die höchste

Bewertungsstufe.

Eigenschaft	Elektr. Mikr.	Immun. Elmi.	Immun. Fluor.	Rota- zyme	Enzy- gnost	Rota- lex
Sensitivität	1	3	1	2	3	2
Spezifität	3	3	3	3	3	3
Reproduzier- barkeit	3	3	3	3	3	3
Praktikabi- lität	1	1	2	3	3	3
Screening- verwendbark.	1	1	1	3	2	3
Kosten	1	1	1	1	3	2

Tab.1: Vergleich von sechs verschiedenen Nachweismethoden zur Rotavirusdiagnostik (nach Morinet et al. 97).

Aus dieser Tabelle ergibt sich die hohe Qualität der beiden ELISA Testverfahren Rotazyme und Enzygnost. Die weitere Entwicklung führte zum Ersatz des üblichen polyvalenten Meerschweinchenserums durch monoklonale Antikörper, die es gestatten auch Serotypen im ELISA sicher zu unterscheiden (14).

1.8 Viruskultivierung

Trotz der hohen Zahl an Viruspartikeln in infektiösen Stühlen und der Tatsache, daß sich Rotaviren in infizierten Populationen sprunghaft weiterverbreiten können, ist es lange Zeit nicht gelungen Rotaviren zu kultivieren (90). Die ersten Rotaviren, deren Adaptation Malherbe und Strickland-Cholmley 1967 (82) gelang, waren der Affenstamm SA 11 und das "O"-Agent. Danach konnten Mebus et al. 1971 (94), Fernelius et al. 1972 (42) den NCDS isolieren und adaptieren. Andere bovine Stämme wurden in England,

Frankreich und Nordirland isoliert (20), (78), (88). In allen Fällen wurden Nierenzellkulturen verwendet. Die ersten Adaptationsversuche menschlicher Rotaviren gelangen 1975 Banatvala et al. (9), der die Zahl infizierter Zellen erhöhte, indem er das Inokulum auf den Zellmonolayer zentrifugierte und Wyatt et al. 1976 (144), der einen Stamm 14 Passagen hintereinander auf menschlichen embryonalen Nierenzellen halten konnte. Andere Forscher arbeiteten auf dieser Basis weiter, jedoch scheiterten höhere Passagen, da die Zahl der infizierten Zellen pro Passage sehr stark sank und nur wenige infektiöse Partikel gebildet wurden (7), (144). 1977 entdeckte Matsuno et al. (83), daß Trypsin einen positiven Effekt auf die Adaptation von Rotaviren hatte. Andere Forscher bestätigten diese Entdeckung (8), (136), (26), (92), (93). Barnett et al. (11) konnte 1979 durch geschickte Experimente mit Trypsininhibitoren beweisen, daß Trypsin direkt das Virus aktiviert und nicht Strukturen an den Zellen der Kultur (11). Der entscheidende Trypsineffekt ist die spezifische Spaltung eines der äußeren Kapselproteine, ohne die der Prozess der Zellinfektion blockiert wird (28), (39), (41). Die erste volle Adaptation eines menschlichen Rotastammes glückte Wyatt et al. 1980 auf AGMK-Zellen (145). Nach 11 Passagen auf gnotobiotisch gehaltenen Ferkeln konnte er das Virus nach Trypsinbehandlung auf AGMK-Zellen weiterpassagieren. Dieses Experiment gelang in Anwesenheit von Trypsin auch auf den kontinuierlichen Zelllinien Ma 104 und CV-1. Weitere erfolgreiche Anzüchtungen von humanen Rotastämmen gelangen 1981 Wissenschaftlern in Japan (122), (140) auf Ma 104 Zellen und CV-1-Zellen. Die dabei für das Wachstum entscheidenden Faktoren waren Trypsinbehandlung und das Rollen der Gewebekulturen in den ersten Passagen. Als voll adaptiert durfte ein Virus erst nach mehreren erfolgreichen Passagen bezeichnet werden (63). Im selben Jahr berichtete Wyatt et al. (146) über weitere positive Isolierungen auf Ma 104 Zellen und AGMK-Zellen. Ein neues Ergebnis stellte Naguib et al. 1983 (98) auf, indem er zeigte, daß die Kultivierung von humanen Rotaviren auf AGMK-Zellen erfolgreicher war als auf Ma 104 Zellen. Dieses Ergebnis wurde 1984 von Ward et al. (142) in seinen Versuchsreihen bestätigt.

Zugleich zeigte er auf, daß Rotaviren aus Stuhlproben leichter auf primären Zellkulturen anzuzüchten sind, als auf kontinuierlichen. Zur Verbesserung schlug er vor, das in den ersten beiden Passagen auf primären Zellen gewonnene Material bei erfolgreicher Züchtung anschließend auf kontinuierliche Zelllinien zu übertragen. Dadurch sei es möglich auch auf kontinuierlichen Zelllinien ähnliche hohe Virustiter zu erhalten wie bei alleiniger Verwendung von primären Zellkulturen.

2. Material und Methoden

2.1 Antigennachweis

Der Antigennachweis in einer Stuhl- oder Mediumprobe wurde mit Hilfe eines ELISA der Firma ABBOTT, der sich unter dem Namen "Rotazyme" im Handel befindet, durchgeführt. Die Testdurchführung erfolgte nach den Richtlinien des Diagnostik Kits. Zur Übersicht eine kurze Darstellung:

Der Test ist auf das Sandwichprinzip aufgebaut, d.h. auf einen Festkörper sind Rotavirusantikörper geschichtet, die mit einer entsprechenden antigenhaltigen Probe (0,2 ml einer 10% Stuhlsuspension bzw. Mediumprobe) einen Komplex bilden (Inkubationszeit 3 h bei 45° C). Nach der Inkubation werden nicht gebundene Partikel durch dreimaliges Waschen mit Aqua dest. entfernt und mit 0,2 ml eines Meerrettich-Peroxidase-Antirotaviruskonjugates nochmals 1 h bei 45° C inkubiert. Im positiven Fall lagert sich dieser Enzymkomplex an den bereits gebildeten Festkörper-Antigenkomplex an und bildet so den Festkörper-Antigen-(Antikörper-Enzym) Sandwich. Nicht gebundenes Konjugat wird durch dreimaliges Waschen mit Aqua dest. entfernt. Anschließend wird die Probe 15 min. mit 0,2 ml O-Phenylendiamin-2-HCl-Substrat versetzt. Die stattfindende Enzym-Substratreaktion wird danach mit 1 ml H₂SO₄ abgestoppt und die Extinktion bei 492 nm gemessen. Als positiv können Proben gewertet werden, deren optische Dichte (OD) größer oder gleich der des mit Hilfe einer negativen Kontrolle ermittelten Grenzwertes ist. Die Quantität der Farbreaktion bzw. der Extinktion ist in weitem Bereich direkt proportional zu der in der Probe enthaltenen Antigenmenge. Die Empfindlichkeit des Testes liegt bei weniger als 10⁷ Viruspartikeln/ml (117).

2.2 RNA-Darstellung

2.2.1 RNA-Extraktion

Die Isolation von Rotavirus-RNA erfolgte aus eingesandten Stuhl-

proben von an akuter Gastroenteritis erkrankten Kindern von Kliniken aus München (Poliklinik, M-Schwabing, M-Harlaching, M-Biederstein), Garmisch-Partenkirchen, Schweinfurt und Passau. Extrahiert wurden im Rotazyme-Test stark positive, schwach positive, grenzwertige und negative Proben. Die Stuhlmenge lag je nach Probe und angewandtem Verfahren (siehe unten) zwischen 0,2 und 1,0 g. Alle dabei benutzten Glasgegenstände wurden vorher silikonisiert. Zur Extraktion wurden zwei Methoden eingesetzt.

2.2.1.1 Direktextraktion nach Theil et al. (137)

Stuhlproben mit einem Gewicht von 0,5 bis 1,0 g wurden in 2 ml eines Extraktionspuffers, bestehend aus :

-0,2 M Glycin (Fa.Merck/Darmstadt)

-0,1 M Natriumhydrogenphosphat (Fa.Merck/Darmstadt)

-0,6 M Natriumchlorid (Fa.Merck/Darmstadt)

-1% Natriumduodecyl-Sulfat pH 9.5 (Fa.Merck/Darmstadt)

suspendiert und durch 20 minütiges Zentrifugieren bei 12000 x g geklärt. Der klare Überstand wurde mit einer Pipette aufgenommen und mit 3 ml Tris-gesättigtem Phenol (Fa.Merck/Darmstadt) und 3 ml eines 24:1 Chlorophorm/Isoamylalkohol-Gemisches (Fa. Merck/Darmstadt) zusammengegeben. Die entstandene milchige Suspension wurde durch Zentrifugation bei 800 x g /4° C 20 Minuten lang getrennt. Der wasserklare, nukleinsäurehaltige Überstand wurde abgesaugt und mit reinem Äthanol (Fa.Baker/Deventer/Holland) bis zu einer Endkonzentration von 15 Vol% versetzt. Dazu wurden ca. 0,5 g Cellulose-Pulver (CF-11 powder, Whatman Inc., Clifton/N.Y./USA) hinzugegeben und eine Stunde heftig geschüttelt. Anschließend wurde die Zellulose bei 800 x g /4° C pelletiert und der Überstand abgekippt. Die pelletierte Cellulose wurde in einem Gemisch aus :

-15% abs. Äthanol (Fa.Baker/Deventer/Holland)

-85% STE-Puffer, bestehend aus: -0,05 M Tris (Fa.Merck/Darmstadt)

-0,1 M NaCl (Fa.Merck/Darmstadt)

-0,001 M EDTA (Fa.Merck/Darmstadt)

aufgenommen und durch nochmaliges Abzentrifugieren bei

800 x g / 4° C gewaschen. Dieser Schritt kann im Bedarfsfall wiederholt werden. Danach wurde die die Suspension in eine Glaschromatographiesäule gegossen und mit 70 ml eines 85%/15% STE-Äthanol Gemisches gewaschen. Zum Schluß wurde die gewaschene dsRNA mit reinem STE-Puffer von der Cellulose gelöst und auf eine Endkonzentration von 66 Vol% Äthanol (Fa.Deventer/Holland) und 0,25 M Na-Acetat (Fa. Merck/Darmstadt) eingestellt und über Nacht bei -20° C präzipitiert. Das Präzipitat wurde danach bei -15° C mit 12000 x g 30 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Sediment lyophilisiert. Die erhaltene Probe wurde in ca. 200 µl sterilem Aqua bidest. aufgenommen und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.1.2 Direktextraktion nach Herring et al. (61)

Bei diesem Verfahren genügen Stuhlmengen von 0,1 g bis 0,2 g. Eine 20% Stuhlsuspension wurde mit einer Pufferlösung bestehend aus: -0,1 M Natriumacetat pH 5,0 (Fa.Merck/Darmstadt)

-1% Natriumduodecylsulfat (Fa.Merck/Darmstadt)

hergestellt. Zu der erhaltenen Suspension wurde das gleiche Volumen einer im Verhältnis 3:2 hergestellten "Phenol"-Chlorophorm Lösung hinzugegeben und eine Minute lang heftig geschüttelt. Die verwendete "Phenol"-Lösung bestand aus:

-500 g Phenol (Fa.Merck/Darmstadt)

-70 g m-Cresol (Fa.Sigma/St.Louis/USA)

-200 g H₂O mit darin gelösten

-0,5 g 8-Hydroxychinolin (Fa.Sigma/St.Louis/USA)

die entstandene milchig trübe Emulsion wurde zehn Minuten bei 1200 x g zentrifugiert und der klare Überstand für die PAGE bei -20° C aufbewahrt.

2.2.2 Gelsystem

Als Gelsystem wurde ein 7%-iges reines Polyacrylamidgel verwendet, das in seiner ursprünglichen Anleitung von Peacock und Dingman (104) stammt, jedoch nach Büttner (23) modifiziert wurde. Es

handelt sich um ein senkrecht laufendes Gelsystem, das von Kalica et al. (68) zur Elektrophorese von Rotavirusgenomen verwendet wurde. Die benützten Glasplatten und Spacer wurden vor jedem Versuch mit Wasser und Flüssigseife mechanisch gereinigt, anschließend mit Aceton (Fa.Merck/Darmstadt) fettfrei gespült. Für das Gel wurden folgende Lösungen hergestellt:

- Polyacrylamid-Lösung (auf 100 ml H₂O) :
 - 30 g Acrylamid (Fa.Bio Rad Laboratories Richmond/Calif./USA)
 - 0,7 g Bisacrylamid (Fa.Serva/Heidelberg)
- Elektrophorese-Puffer (10-fach konz., auf 1000 ml H₂O)
 - 107,8 g Tris (Fa.Merck/Darmstadt)
 - 55,03 g Borsäure (Fa.Merck/Darmstadt)

Zur Verwendung in der PAGE wurde die 10-fach konzentrierte Pufferlösung durch Verdünnen mit H₂O auf die einfache Konzentration eingestellt. Zur Herstellung eines Gels wurde eine Lösung aus:

- 10,5 ml Acrylamid-Lösung
- 4,5 ml Elektrophorese-Puffer (10-fach)
- 30 ml H₂O bidest

in einen Vakuumkolben pipettiert und einige Minuten entgast. Danach wurden 50 µl TEMED (Fa.Sigma/St.Louis/USA) und 300 µl Ammoniumpersulfat (Fa.Serva/Heidelberg) hinzupipettiert, kurz geschwenkt und in die bereitstehende Gelkammer gegossen. Das Gel wurde nun drei Stunden auf einer erschütterungsfreien Unterlage bei Raumtemperatur zur Polymerisation aufbewahrt. Die verwendeten Glasplatten der Gelkammer hatten die Größe von 17,5 x 17 cm, die Spacerdicke betrug 0,1 cm.

Die zu untersuchenden RNA-Proben (10 µl) wurden zusammen mit 20 µl Färbepuffer bestehend aus:

- 3 g Saccharose /10 ml H₂O (Fa.Merck/Darmstadt)
 - 0,1% Xylenzyanol (Fa.Bio Rad Laboratories Richmond/Calif./USA)
- gemischt und in die Startlöcher gegeben. Die Elektrophorese erfolgte mit einfach konzentriertem Puffer bei Raumtemperatur. Die Laufzeit variierte in Abhängigkeit von der Stromstärke. Bei sehr hohen Stromstärken (30 mA, 250 V) betrug die günstigste Laufzeit vier Stunden, bei niedrigen (5 mA, 100 V) 12 Stunden.

2.2.3 Färbung

Die fertigen Gele wurden nach der Methode von Sammons et al. (120) angefärbt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zuerst in 500 ml H_2O mit 10% Äthanol (Fa.Baker/Deventer/Holland) und 0,5% Essigsäure (Fa.Merck/Darmstadt) 30 Minuten lang unter leichtem Schwenken gewaschen. Danach wurde das Gel in der Färbelösung, bestehend aus 0,76 g $AgNO_3$ (Fa.Merck/Darmstadt) auf 400 ml Aqua dest. eine Stunde gewässert. Anschließend wurde die Silbernitratlösung verworfen und das Gel viermal mit dest. Wasser gewaschen. Die Entwicklung erfolgte fünf bis acht Minuten in einer Lösung aus 0,036 g Natriumborhydrid (Fa.Merck/Darmstadt), 1,62 ml Formalin (Fa.Merck/Darmstadt) und 6 g Natriumhydroxyd (Fa.Merck/Darmstadt) auf 400 ml H_2O . Nach der Färbung wurde das Gel 20 Minuten in Natriumbikarbonat (Fa.Merck/Darmstadt) fixiert. Die Aufbewahrung erfolgte in einer Plastikfolie bei 4° C. Zur Dokumentation wurden die Gele auf einer beleuchteten Glasplatte photographiert.

2.3 Klassifizierung der Elektropherotypen

Bei der Klassifizierung der in der PAGE vorgefundenen Rotavirusgenome kam das von Lourenco et al. (80) vorgeschlagene Schema zur Anwendung. Dabei werden die elf Segmente des Genoms in vier Gruppen aufgeteilt (siehe Kap.1.2). Migrationsunterschiede innerhalb der jeweiligen Gruppe werden mit kleinen Buchstaben gekennzeichnet (a-f). Als Referenzstamm dient der Affenstamm SA-11. (Siehe Abb.7)

Bei der quantitativen Auswertung hinsichtlich der RNA-Konzentration isolierter Proben in der PAGE wurde als subjektives Maß eine Einteilung von 0 bis 3 eingeführt, die folgendermaßen definiert ist:

- 0 = negativ
- 1 = schwach sichtbare Banden
- 2 = deutlich sichtbare Banden
- 3 = stark sichtbare Banden

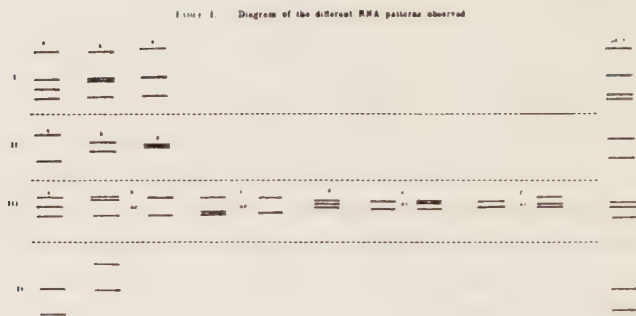


Abb.7: Schematische Einteilung der Genomprofile humaner Rotaviren (nach Lourenco et al. (80))

2.4 Kultivierung

Als Basis für die in dieser Arbeit vorgenommenen Isolierungsversuche diente das von Sato et al. 1981 (122) entwickelte Kultivierungsverfahren in modifizierter Form.

Zur Isolierung wurden Ma 104 Zellen, eine permanente Zelllinie aus embryonalen Rhesusaffennierenzellen aus den Labor von Prof. Bachmann (Tiermedizinische Fakultät der Universität München) verwendet. Frisch gesplittete Zellen der 88. bis 110. Passage wurden zusammen mit 2 ml Wachstumsmedium (Eagle's minimum essential Medium (MEM) (Fa. Gibco/Paisley/Schottland), 10% Fetalem Kälber Serum (FCS) (Fa. Gibco/Paisley/Schottland), 3% Bikarbonat-Lösung (Fa. Merck/Darmstadt), 6,2 g/50ml (1600 IE/mg) Penicillin (Fa. Grünenthal/Stalberg/Rhld), 15 g/100ml Streptomycin (Fa. Grünenthal/Stalberg/Rhld) in Gewebekulturröhrchen einpipettiert und 2 - 3 Tage bei 37° C angezüchtet bis der Zellrasen dicht war. Für die Inokulation wurden rotaviruspositive, in ELISA und PAGE vorgetestete Stuhlproben verwendet.

Zuerst wurde eine 10% - 20% (wt/vol) Stuhlsuspension mit MEM hergestellt und bei 1500 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde nochmals 1:10 verdünnt und wiederum bei 1500 x g zentrifugiert. Das so erhaltene Inokulum wurde mit verschiedenen hohen Acetyl-Trypsin Konzentrationen (10-40 µg/ml) (Fa.Sigma/St.Louis/USA) 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Gleichzeitig wurden die verwendeten Rollerulturen dreimal mit je 2 ml MEM ohne FCS ausgewaschen. Nach der Vortrypsinierung wurden die Inokula zu je 0,3 ml auf die Zellkultur gegeben und eine Stunde bei 37° C in einem Rollerapparat inkubiert. Danach wurde das Inokulum durch dreimaliges Waschen mit trypsinhaltigem MEM (1µg/ml) entfernt und 2 ml Erhaltungsmedium (MEM, 3% Bikarbonat, 1% NEAA (Fa.Gibco/Paisley/ Schottland), Penicillin, Streptomycin und variable Acetyl-Trypsinkonzentrationen (1-40µg/ml) hinzupipettiert. Der erste Mediumwechsel erfolgte 2 - 4 Tage nach der Inokulation, in Abhängigkeit vom mikroskopischen Bild, das die Kultur zeigte. Weitere Medienwechsel erfolgten in drei bis vier Tagesabständen. Bei jedem Mediumwechsel wurde die gewonnene Probe im Rotazyme ELISA auf Viruswachstum hin überprüft. Kam es nach spätestens 20 Tagen zu keiner positiven Reaktion wurden die Kulturen durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen geknackt. Diese Proben wurde ebenfalls im ELISA untersucht. Positive Proben wurden bei -70° C aufbewahrt. Weitere Passagen erfolgten nach dem oben beschriebenen Verfahren mit unverdünnten Mediumproben.

Veränderungen gegenüber diesem Verfahren wurden nach Arbeiten von Kutsuzawa (75), Urasawa (140), Hasegawawa (60), Offit (102) und eigenen Vorstellungen unternommen.

Im Einzelnen wurden folgende Schritte untersucht:

-Zuerst wurde die Trypsindosis bei der Vorbehandlung des Inokulums variiert. Die in der Literatur angegebenen Konzentrationen schwanken von 10µg/ml bis 40µg/ml.

-Ferner wurden zwei unterschiedliche Inokulationsverfahren miteinander verglichen. So wird -im Gegensatz zu der von Sato et

al. (122) angewandten Methode- das Inokulum von Hasegawa et al. (60) nach der einstündigen Adsorption nicht ausgewaschen, sondern in der Kultur belassen. Zusätzlich wird das Erhaltungsmedium hinzupipettiert.

-Als weitere Änderung wurde die Trypsinkonzentration im Erhaltungsmedium schrittweise von $1\mu\text{g/ml}$ bis $40\mu\text{g/ml}$ gesteigert und die Resultate verglichen.

-Auch die Zusammensetzung des Erhaltungsmediums wurde variiert. Da die Verwendung von FCS bei der Isolierung von humanen Rotaviren kontraindiziert ist, benutzen einige Autoren, wie z.B. Sato (122) im Erhaltungsmedium den Ersatzstoff " Tryptose Phosphat Broth (TPB) "(Fa.Difco/Detroit/USA), andere, wie z.B. Urasawa (140) verwenden keinen Mediumersatzstoff.

-Als letzte Variante wurde eine Änderung des Inokulationsmodus vorgenommen. Hierbei wurden zu einen Tag alten, relativ dünn (Zellrasendichte ca. 60-70%) eingesäeten Rollerkulturen frisch trypsinierte Zellen, mit dem vorbereiteten Inokulum (0,3 ml) und 2 ml Erhaltungsmedium (MEM, 10% TPB, 3% Bikarbonat, 1% NEAA, Penicillin, Steptomycin und $4\mu\text{g/ml}$ Acetyl-Trypsin) zusammen hinzugegeben und inkubiert. Das Medium wurde nach 24 Stunden gewechselt.

3. Ergebnisse

3.1 Gelelektrophorese und Epidemiologie

Insgesamt wurden 95 (100%) Stuhlproben von durchfallerkrankten Kindern aus verschiedenen Kliniken Bayerns auf ihr Verhalten in der PAGE hin untersucht. Davon waren 58 (61%) im Rotazyme-ELISA positiv, 4 (4%) grenzwertig und 33 (35%) negativ. Die Zeitspanne der untersuchten Proben erstreckte sich von Februar 1983 bis August 1984.

Von den 58 (100%) rotazyme-positiven Proben (OD von 0,15-2,0) hatten 46 (79%) klar erkennbare Rotavirus-Genomprofile. 12 (21%) waren in der PAGE negativ. Bei den 4 grenzwertigen Proben waren in keinem Fall rotatypische RNA-Banden nachzuweisen, ebenso waren sämtliche 33 negativen Proben in der PAGE negativ.

Betrachtet man die in der PAGE erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich ihres Verhaltens im ELISA, kann man nicht von einer deutlichen Korrelation zwischen relativer RNA-Konzentration in der Gelelektrophorese und Höhe der OD-Units im ELISA sprechen (siehe Abb. 8). So gibt es bei Proben, die im ELISA hohe OD-Werte hatten, in der PAGE sowohl negative, schwach positive, als auch stark positive Genompattern. Andererseits kamen auch bei Proben mit niedrigen OD-Units im ELISA Isolate mit stark sichtbaren Genomprofilen im Gel vor.

Jedoch deutet sich eine gewisse Nachweisgrenze an, unter der in der Gelelektrophorese keine Genomprofile mehr entdeckt werden können, da die Proben mit stark sichtbaren Pattern nicht unter eine minimale OD-Grenze von 0,7 im ELISA absinken, Proben mit deutlich sichtbaren Genomprofilen etwas darunter liegen (OD 0,6) und schwach sichtbare Pattern bis zu einer OD von 0,38 abtruschten. Auffallend ist das Auftreten von Stuhlproben mit fehlendem RNA-Gehalt in der PAGE, deren Antigennachweis im Rotazyme-Test jedoch z.T. niedrig positiv (OD 0,09-0,15), z.T. hoch positiv (OD 0,95-2,0) ausfiel.

Bei den 46 in der PAGE positiv isolierten Proben traten 7 verschiedene Genomprofile nach Lourenco et al. (80) auf (siehe Abb.9

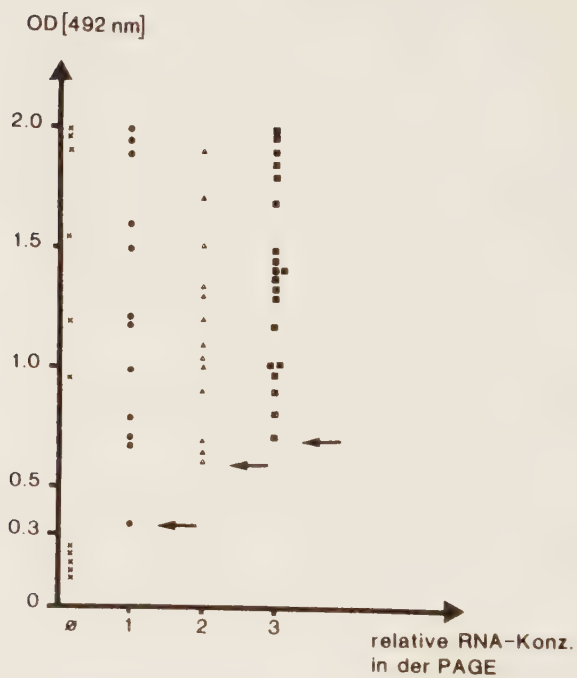


Abb.8: Ergebnisse der PAGE bezogen auf die Höhe der OD im ELISA bei rotazyme-positiven Stuhlproben.

und Abb.10). Unter den verschiedenen Genomprofilen kam der Typ 1b 2a 3e 4/II, also ein "long-type" nach Espejo et al (36), in seinen beiden Erscheinungsformen nach Lourenco et al. (80) (A₁, A₂, siehe Abb.9), 37 mal vor. Dies entspricht einer Häufigkeit von 80% im Stichprobenumfang. Das Verhältnis von Genomprofilen mit kurzem Migrationsverhalten der Banden 10 und 11, von Espejo et al.(36) als "short-type" bezeichnet zu "long-type"-Profilen betrug 5 von 46, was 11% entspricht. Nach Elektrophorese-Typen aufgeschlüsselt ergab sich damit folgende Tabelle (Tab.2).

Typ	Bezeichnung	Vorkommen/Häufigkeit
1b 2a 3e 4/II (37)	A ₁ , A ₂	Schweinfurt (15), Garmisch-Partenkirchen (5), M.-Schwabing (5), M.-Biederstein (5), M.-Kinderpoliklinik (5), M.-Harlaching (1), Passau (1)
1b 2b 3b 4/II (1)	B	M.-Kinderpoliklinik (1)
1b 2b 3e 4/II (1)	C	Garmisch-Partenkirchen (1)
1b 2a 3a 4/II (1)	D	M.-Schwabing (1)
1b 2a 3b 4/II (1)	E	M.-Kinderpoliklinik (1)
1c 2a 3a 4/I (1)	F	M.-Kinderpoliklinik (1)
1c 2a 3c 4/I (4)	G	M.-Kinderpoliklinik (2), Garmisch-Partenkirchen (1), M.-Biederstein (1)

Tab.2: Isolierungsorte der verschiedenen Rotavirus-Genomprofile.
(M=München).

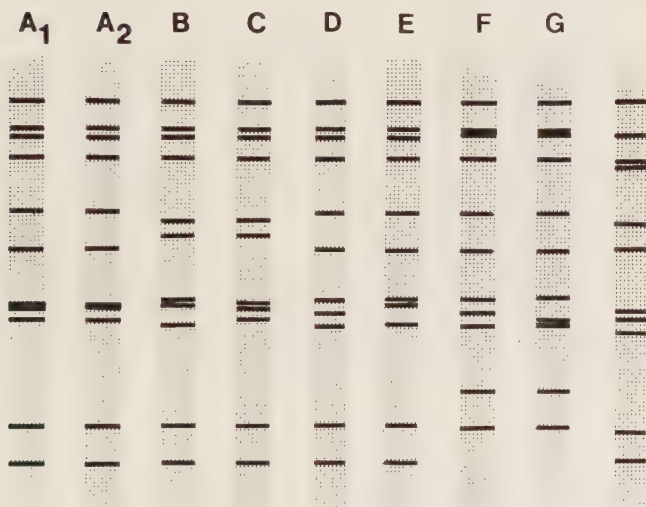
Daraus wird das starke Vorherrschen eines Genomtypen während des Beobachtungszeitraumes ersichtlich, während andere Genomprofile nur vereinzelt vorkommen. Schlüsselt man die Ergebnisse nach ihrem Auftreten in den einzelnen Krankenanstalten auf, ergibt sich folgendes Bild (siehe Tab.3).

Vorkommen	Häufigkeit	Typ	Bezeichnung
M.-Kinderpoliklinik	5x	1b 2a 3e 4/II	A ₁ , A ₂
	1x	1b 2a 3b 4/II	E
	1x	1b 2b 3b 4/II	B
	1x	1c 2a 3a 4/I	F
	2x	1c 2a 3c 4/I	G
M.-Schwabing	5x	1b 2a 3e 4/II	A ₁ , A ₂
	1x	1b 2a 3a 4/II	D
M.-Harlaching	1x	1b 2a 3e 4/II	A ₁
M.-Biederstein	5x	1b 2a 3e 4/II	A ₁ , A ₂
	1x	1c 2a 3c 4/I	G
Garmisch-Parten- kirchen	5x	1b 2a 3e 4/II	A ₁ , A ₂
	1x	1b 2b 3e 4/II	C
	1x	1c 2a 3c 4/I	G
Schweinfurt	15x	1b 2a 3e 4/II	A ₁ , A ₂
Passau	1x	1b 2a 3e 4/II	A ₂

Tab.3: Häufigkeit der isolierten Genomprofile an den untersuchten Kliniken. (M=München).

Aus diesem Ergebnis sind folgende Aussagen abzuleiten:

1. Eine große Typenvielfalt mit Überwiegen eines vorherrschenden Genomtypen (1b 2a 3e 4/II) in der Kinderpoliklinik in München.
2. Ausschließliches Vorkommen des vorherrschenden Genomtyps im Krankenhaus Schweinfurt.
3. Starkes Überwiegen des Prävalenztypen in den übrigen Krankenhäusern mit sporadischem Auftreten anderer Genomtypen.



SA-11

Abb.9: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit entdeckten Genomprofile.

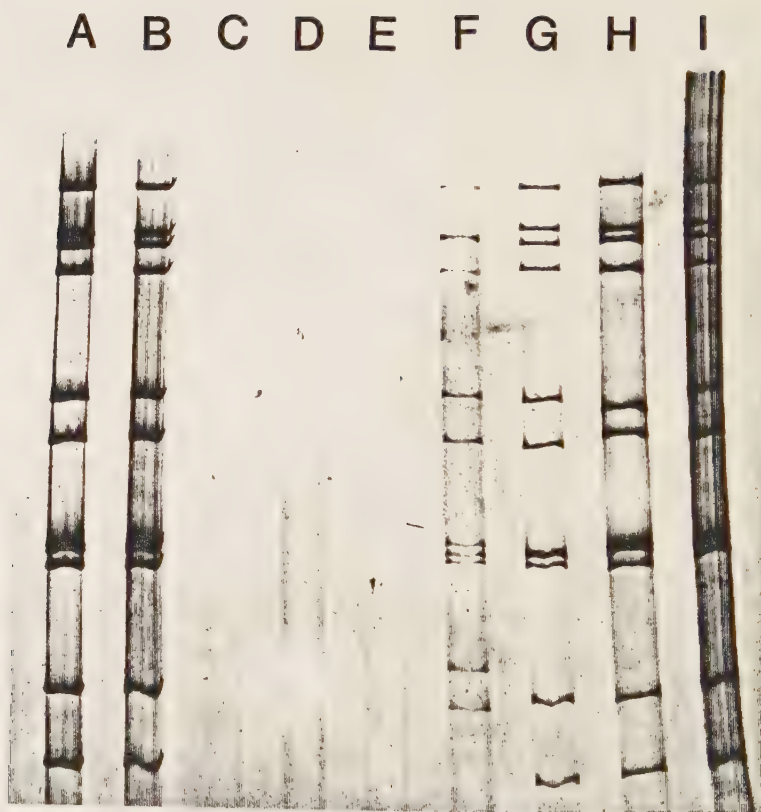


Abb.10: Genomprofile verschiedener Stuhlproben in der PAGE.

A, B: Krankenhaus Schweinfurt.

C, D: Negative Stuhlproben aus dem Krankenhaus München-Schwabing.

E: Negative Stuhlprobe aus dem Krankenhaus Schweinfurt.

G: Krankenhaus Garmisch-Partenkirchen.

F, H, I: Kinderpoliklinik München.

3.2 Viruskultivierung

3.2.1 Variation der Trypsinkonzentration bei der Vorbehandlung des Inokulums

In diesem Experiment sollte geprüft werden, ob die Variation der Trypsindosierung bei der Vortrypsinierung des Inokulums einen Einfluß auf das Anzüchtungsverhalten von humanen Rotaviren in der Gewebekultur hat.

Dazu wurde die Trypsinkonzentration schrittweise von 10µg/ml, auf 20µg/ml und 40µg/ml erhöht. Die Inokulation wurde nach der von Sato et al. (122) beschriebenen Methode (siehe Kap. 2.4) durchgeführt. Das Erhaltungsmedium enthielt 1µg/ml Trypsin. Die Versuche wurden mit Stuhlproben von 8 verschiedenen Patienten in Doppel-, teilweise in Dreifach-Ansätzen durchgeführt. Während der Isolationsversuche zeigte es sich, daß im Falle einer positiven Reaktion Virusantigen zwischen dem 3. und 6. Tag im Medium nachgewiesen werden konnte. Zwischen dem 5. und 8. Tag konnten auch mikroskopisch geringgradige Veränderungen in den infizierten Kulturen nachgewiesen werden (genaue Beschreibung siehe Kap.3.2.7.).

Insgesamt kam es bei diesen Versuchen unabhängig von der verwendeten Trypsindosierung in der I. Passage zu ca. 60% antigenpositiven Isolierungen. Hinsichtlich der verwendeten Stuhlproben war zumindest ein Kulturansatz je Stuhlprobe sicher antigenhaltig. Somit konnten von den 8 verschiedenen Proben alle 8 primär in der I. Passage isoliert werden.

In der II. Passage, die mit den positiven Isolaten der I. Passage unter den gleichen Versuchsbedingungen wie oben beschrieben vorgenommen wurde, zeigte sich eine deutliche Senkung der Isolierungsquote auf ca. 30%. In Falle einer positiven Isolierung konnte Virusantigen zwischen dem 6. und 9. Tag nachgewiesen werden. Auch die mikroskopischen Veränderungen, die denen der I. Passage gleichen, traten etwas später, d.h. zwischen dem 5. und 9. Tag auf. Hierbei wurden auch nicht von jeder Probe positive Isolierungen erreicht. So konnte bei einer Trypsinkonzentration von 10µg/ml mit 4 positiven und 2 grenzwertigen Ergebnissen von 16 Ansätzen 4

von 8 Proben isoliert werden. Bei einer Trypsinkonzentration von 20µg/ml bez. 40µg/ml wurden 5 von 18 bez. 19 Ansätzen positiv. Hierbei konnten von 8 verschiedenen Proben 5 in die II. Passage isoliert werden.

Versuche, die in der II. Pasage erhaltenen positiven Proben unter den gleichen Versuchsbedingungen höher zu passagieren scheiterten.

Insgesamt zeigte keine der verschiedenen Dosierungen eine deutliche Steigerung der Isolierungsquote im Vergleich zu den anderen. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine Variation der Trypsindosierung zwischen 10µg/ml und 40µg/ml eine gleichbleibende Isolierungsquote bewirkt. Die Vortrypsinierung wurde deshalb auf einen Trypsingehalt von 20 µg/ml eingestellt. In Tabelle 4 sind die in dieser Versuchsreihe erzielten Ergebnisse synoptisch dargestellt.

Passage- höhe	Tryp.- konz	Ansätze insges.	Isolierte Proben			Antigen positiv nach n Tagen
			pos.	grenz.	neg.	
I	10 µg/ml	25	15 (60%)	5 (20%)	5 (20%)	3 - 6
I	20 µg/ml	33	20 (61%)	7 (21%)	6 (18%)	3 - 6
I	40 µg/ml	24	15 (62%)	4 (17%)	5 (21%)	3 - 6
II	10 µg/ml	16	4 (25%)	2 (12%)	10 (63%)	6 - 9
II	20 µg/ml	18	5 (28%)	4 (22%)	9 (50%)	6 - 9
II	40 µg/ml	19	5 (26%)	4 (21%)	10 (52%)	6 - 9

Tab.4: Synopsis der Versuchsergebnisse bei der Variation der Trypsinkonzentration bei der 30-minütigen Vortrypsinierung des Inokulums.

3.2.2 Vergleich zweier Inokulationsverfahren

Des weiteren wurden zwei in der Literatur beschriebene Inokulationsmethoden einander gegenübergestellt. Dabei wurden das Auswaschen (A) des Inokulums (Sato et al. 122) mit dem Belassen (B) desselben nach der einstündigen Inokulation (Hasegawa et al. 60) verglichen. Damit sollte untersucht werden, ob die bei Belassen des Inokulums in der Kultur verbleibende hohe Anzahl an Viruspartikeln zu einer größeren Zellinfektionsrate führt und damit einen steigernden Einfluß auf die Kultivierbarkeit *in vitro* hat.

Die Inokula wurden mit 20 µg/ml Trypsin 30min bei 37° C vortrypsiniert. Das Erhaltungsmedium enthielt 1 µg/ml Trypsin. Die Versuche wurden mit Stuhlproben von 8 verschiedenen Patienten in Doppel-, teilweise in Dreifachansätzen durchgeführt. In der I. Passage dieser Versuchsreihe konnte Antigen bei gelungener Isolierung zwischen dem 3. und 6. Tag post infectionem sowohl bei Verfahren A, als auch bei Verfahren B nachgewiesen werden. Mikroskopisch traten geringgradige Zellveränderungen nach 5 bis 8 Tagen auf (Beschreibung siehe Kap.3.2.7.).

In der I. Passage lag die Isolierungsquote bei Verfahren A bei 60%, bei Verfahren B bei 66%. In beiden Versuchsreihen gelang es von allen 8 verwendeten Stuhlproben zumindest eine antigenpositive Kultur unter den verschiedenen Isolierungsverfahren zu erhalten.

Mit den gewonnenen Primärisolaten wurden die Versuchsreihen analog den Versuchsbedingungen der I. Passage in die II. Passage geführt. Hierbei zeigte sich ein Absinken der Isolationsquote. Unter Verfahren A konnten 25% der Ansätze zu einem positiven Ergebnis geführt werden, wobei die Passagierung von 5 von 8 aus der I. Passage erhaltenen Primärisolierungen gelang. Antigen konnte zwischen dem 6. und 9. Tag nachgewiesen werden.

Bei Verfahren B lag die Isolierungsquote in der II. Passage bei 35%. Auch hier konnten von 8 antigenpositiven Proben aus der I. Passage 5 in die II. Passage geführt werden. Ein positiver Antigennachweis konnte bei Verfahrensweise B zwischen dem 3. und 9. Tag geführt werden.

Vergleicht man die bei dieser Versuchsreihe erhaltenen Ergebnisse (siehe Tab.5), scheint eine positive Tendenz in Richtung auf das Belassen des Inokulums zu bestehen, jedoch stellte sich bei weiteren Passageversuchen heraus, daß sämtliche nach Verfahren B in der II. Passage positiven Kulturen in der III. Passage negativ blieben. Hingegen konnten von den 5 nach Verfahren A in der II. Passage positiven Ansätzen 3 in die III. Passage geführt werden. Von diesen konnte eine Probe auch in die IV. Passage gebracht werden. Mikroskopisch sichtbare Veränderungen der Gewebekulturen konnten sowohl in der III. als auch in der IV. Passage nicht mehr beobachtet werden. Zusätzlich vergrößerte sich die Zeitspanne bis zum positiven Antigennachweis auf 9 - 12 Tage in der III., bzw. 16 Tage in der IV. Passage. Versuche höherer Passagierungen jedoch scheiterten. Es wurde daher bei weiteren Versuchen der Inokulationsmodus A gewählt.

Passage- höhe	Inokul.- modus	Ansätze insges.	Isolierte Proben			Antigen pos. nach n Tagen
			pos.	grenz.	neg.	
I	A	32	19 (60%)	6 (19%)	7 (22%)	3 - 6
I	B	30	20 (66%)	0 (0%)	10 (33%)	3 - 6
II	A	19	5 (26%)	0 (0%)	12 (74%)	6 - 9
II	B	20	7 (35%)	3 (15%)	10 (50%)	6 - 9

Tab.5: Synopsis des Vergleichs der Inokulationsverfahren nach Sato et al. (122) = Verfahren A und Hasegawa et al. (60) = Verfahren B.

3.2.3 Variation der Trypsinkonzentration im Erhaltungsmedium

In dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob eine Variation der Trypsinkonzentration im Erhaltungsmedium die Rate an neugebildeten infektiösen Viruspartikeln zu steigern vermag und somit zu einer Verbesserung der Virusadaptation führt. Die Aufteilung der Dosierung erfolgte in Schritten von 1, 2, 4, 8, 10, 20, 40 µg/ml Trypsin. Die Inokulation wurde nach der Methode von Sato et al. (122) vorgenommen. Das Virusinokulum wurde mit einer Trypsindosis von 20 µg/ml 30 min. bei 37° C incubiert. Diese Versuche wurden mit Stuhlproben von 6 verschiedenen Patienten in Doppel-, teilweise in Dreifachansätzen vorgenommen.

In Fällen einer positiven Isolierung konnte in der I. Passage Virusantigen zwischen dem 3. und 6. Tag, in der II. Passage zwischen dem 6. und 9. Tag nachgewiesen werden. Mikroskopisch konnte sowohl in der I. als auch in der II. Passage deutlich zwischen einer hohen (10 - 40 µg/ml) und einer niedrigen (1 - 8 µg/ml) Trypsindosierung unterschieden werden. Während sich bei der niedrigen Dosierungsgruppe geringe morphologische Veränderungen analog den in Kap.3.2.7. beschriebenen nach 5 - 8 Tagen einstellten, zeigten Ansätze mit einer hohen Trypsindosierung (10 - 40 µg/ml) eine ab dem 3. Tag post infectionem beginnende - vermutlich toxisch bedingte - Degeneration des Zellrasens, die über eine sternförmige Zelldeformierung (siehe Abb.11) zum vorzeitigen Ablösen der Zellen nach 5 - 9 Tagen führte. Die höchste von dieser Nebenwirkung freie Trypsinkonzentration war 8 µg/ml.

Im Sinne der Fragestellung gab es sowohl innerhalb, als auch zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede. Positive Isolierungen gelangen in der I. Passage um die 60%. Auch wurde mit beiden Dosierungsgruppen von allen Stuhlproben zumindest ein Ansatz primärisoliert.

In der II. Passage, die mit positiven Isolierungen von 4 verschiedenen Stuhlproben der I. Passage durchgeführt wurde, zeigte sich wieder eine deutliche Senkung der Isolierungsquote auf 30% - 40%. Von den 4 Proben wurden mit der niedrigen Dosierung 3 Proben in die II. Passage geführt, mit der hohen Dosierung 2 Proben.

Eine III. Passage wurde nicht unternommen. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Insgesamt wird an dem Ergebnis deutlich, daß eine Erhöhung der Trypsindosierung im Medium keine Verbesserung der Virusisolierung bewirkt. Statt dessen muß aufgrund der Resultate bei einer Trypsinkonzentration über 8 µg/ml mit vermutlich toxischen Nebenwirkungen des Trypsins auf den Zellrasen gerechnet werden. Für die weiteren Isolierungsversuche wurde eine Trypsinkonzentration von 4 µg/ml gewählt.

Passage- höhe	Tryp.- konz	Ansätze insges.	Isolierte Proben			Antigen pos. nach n Tagen
			pos.	grenz.	neg.	
I	1 - 8 µg/ml	45	26 (59%)	8 (17%)	10 (24%)	3 - 6
I	10-40 µg/ml	42	26 (62%)	9 (21%)	7 (17%)	3 - 6*
II	1 - 8 µg/ml	25	10 (40%)	2 (8%)	13 (52%)	3 - 6
II	10-40 µg/ml	27	8 (30%)	4 (15%)	15 (55%)	3 - 6*

Tab.6: Zusammenfassung der Ergebnisse unterschiedlicher Trypsindosierungen im Erhaltungsmedium. * = Toxisch-degenerative Veränderungen des Zellrasens nach 3 Tagen und Ablösung des Zellrasens nach 5 - 8 Tagen.

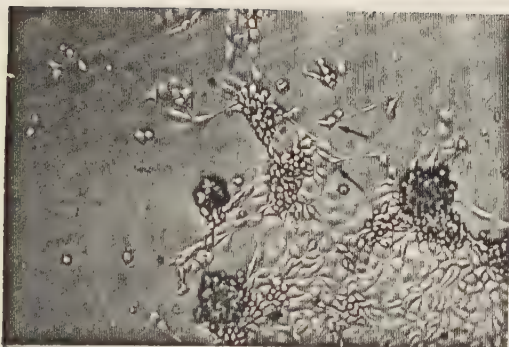


Abb.11: Toxische Trypsinwirkung auf den Zellrasen bei Trypsinkonzentrationen über $8\mu\text{g/ml}$. Sternförmige Zelldeformierung nach 3 Tagen (siehe Pfeile) und Ablösung des Zellrasens nach 5 - 8 Tagen.

3.2.4 Zugabe von TPB zum Erhaltungsmedium

Als weitere Versuchsänderung wurde der Einsatz von Tryptose-Phosphat-Lösung (TPB) wie bei Sato et al. (122) beschrieben untersucht. Hierbei sollte geklärt werden, ob die Verwendung von Medium mit oder ohne TPB bei der Kultivierung von HRV eine Rolle spielt, denn in der Literatur sind erfolgreiche Adaptationen sowohl bei Verwendung TPB-freien Mediums (Urasawa et al. (140)), wie auch TPB-haltigem Mediums (Sato et al. (122)) beschrieben.

Die Inokula beider Versuchsreihen wurden mit 20 µg/ml Trypsin bei 37° C 30 min. vortrypsiniert. Die Inokulation erfolgte nach der Methode von Sato et al. (122). Das Erhaltungsmedium enthielt 4 µg/ml Trypsin und je nach Versuchsreihe 10% TPB bzw. kein TPB. Die Versuchsreihe ohne TPB-Zusatz wurde mit Stuhlproben von 9 verschiedenen Patienten vorgenommen. Aufgrund teilweise zu geringer Stuhlmengen konnten von den oben erwähnten 9 Patientenproben nur 5 bei der Versuchsreihe mit TPB-Zusatz Verwendung finden.

In der I. Passage wurde Antigen bei beiden Versuchsreihen zwischen dem 3. und 6. Tag nachgewiesen. Mikroskopische Veränderungen traten in beiden Versuchsreihen nach dem 5. - 9. Tag auf (siehe Kap.3.2.7.). Die Isolationsquote in der I. Passage lag bei Medien ohne TPB bei 65%, wobei von allen 9 verwendeten Stuhlproben zumindest eine Primärisolierung gelang. Bei Medien mit TPB lag die Quote geringfügig höher bei 72%. Auch hier wurden von den 5 verschiedenen Stuhlproben alle 5 in der I. Passage erfolgreich isoliert.

In der II. Passage lag die Isolierungsquote bei TPH-freien Medien bei 43%, wobei von den 9 in der I. Passage erhaltenen Primärisolaten 6 ebenfalls in der II. Passage passagieisoliert wurden. In der Reihe mit TPB-haltigem Medium wurden von 30 Ansätzen 19 in einem Zeitraum von 3 - 6 Tagen positiv, was einer Rate von 63% entspricht. Hier wurden alle 5 Primärisolate aus der I. Passage erfolgreich in die II. Passage geführt.

Aus den Resultaten wird ersichtlich, daß bei TPB-Zusatz in der in der II. Passage eine deutliche Steigerung positiver Isolierungen beobachtet werden kann. Der Unterschied in der II. Passage ist

jedoch vermutlich aufgrund der begrenzten Probenzahl nicht signifikant ($\chi^2=1,7$). Bei weiteren Passageversuchen konnten von den 6 positiven Kulturen der II. Passage bei TPB-freien Medium noch eine Probe in die III. Passage geführt werden und anschließend auch noch in die IV. Weitere Passageversuche schlugen fehl.

Mikroskopisch sichtbare Veränderungen der Gewebekulturen konnten sowohl in der III. als auch in der IV. Passage nicht mehr beobachtet werden. Zusätzlich vergrößerte sich die Zeitspanne bis zum positiven Antigennachweis auf 12 Tage in der III., bzw. 16 - 20 Tage in der IV. Passage.

Bei Verwendung TPB-haltigen Mediums konnten 4 Proben in die III., 3 in die IV., und eine in die V. Passage geführt werden. Auch hier konnten ab der IV. Passage keine mikroskopischen Veränderungen mehr beobachtet werden. Die Zeitintervalle bis zum positiven Antigennachweis verschoben sich gleichfalls ab der IV. Passage auf den 12., bez. 16 - 18. Tag post infectionem.

Als Resultat dieser Versuchreihen kann man sagen, daß die Verwendung von TPB zum Erhaltungsmedium eine Verbesserung der Isolierungsquote hinsichtlich der Stuhlprobenanzahl und der Passagehöhe ermöglicht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 7 und 8 nochmals synoptisch dargestellt.

Passage- höhe	TPB- zusatz	Ansätze insges.	Isolierte Proben			Antigen pos. nach n Tagen
			pos.	grenz.	neg.	
I	neg.	20	13 (65%)	2 (10%)	5 (25%)	3 - 6
I	pos.	21	15 (72%)	2 (9%)	4 (19%)	3 - 6
II	neg.	28	12 (43%)	3 (11%)	13 (46%)	6 - 9
II	pos.	30	19 (63%)	2 (7%)	9 (30%)	6 - 9

Tab.7: Zusammenfassende Darstellung der Isolierungsquoten ohne bzw. mit TPB-Zusatz in der I. und II. Passage.

Passage- höhe	TPB- zusatz	Proben/ Isolate	Ansätze insges.	TPB zusatz	Proben/ Isolate	Ansätze insges.
I	neg.	9	21	pos.	5	20
II	neg.	6	28	pos.	5	30
III	neg.	1	12	pos.	4	16
IV.	neg.	1	4	pos.	3	12

Tab.8: Vergleich der Anzahl positiv isolierter Stuhlproben und der erreichten Passagehöhe bei Verwendung TPB-freien bzw. TPB-haltigen Mediums.

3.2.5 Variation des Inokulationsmodus

Als letzte Variante wurde das Inokulationsverfahren geändert. Dabei wurden 0,3 ml Inokulum zusammen mit frisch gesplitteten Ma 104 Zellen, die in 2 ml Erhaltungsmedium (MEM, 3% Bicarbonat, 1% NEAA, 10% TPB, 4 µg/ml Trypsin, Penicillin, Streptomycin) suspendiert waren, in eine relativ dünn eingesäete Rollerkultur (60% - 70% Zellrasendichte) gegeben und 24 h bei 37° C inokuliert. Danach wurde das Medium und nicht angewachsene Zellen dekantiert und 2 ml neues Erhaltungsmedium hinzupipettiert. Der nächste Mediumwechsel fand 3 Tage später statt. Die Vortrypsinierung des Inokulums erfolgte bei 37° C 30 min. lang mit 20 µg/ml Trypsin. Dieses neue Inokulationsverfahren wurde Zell-Supplement-Verfahren (ZSV) benannt.

Dabei sollte geprüft werden, ob durch das neue Verfahren, das den Kontakt des Virus mit Zellen in verschiedenen Zellreifungsstadien erlaubte, eine Verbesserung der Kultivierbarkeit von HRV erreichbar wäre. Bei dem Inokulationsverfahren nach Sato et al. (122) wird im Gegensatz zum ZSV ein mehrere Tage alter einheitlicher Zellmonolayer infiziert. Diese Versuche wurden mit Stuhlproben 3 verschiedener Patienten durchgeführt. Dabei ergaben sich in den ersten beiden Passagen folgende Ergebnisse (Tab.9):

Passage- höhe	ZSV	Ansätze insges.	Isolierte Proben			Antigen pos. nach n Tagen
			pos.	grenz.	neg.	
I	pos.	33	31 (94%)	1 (3%)	1 (3%)	1 - 3
II	pos.	27	25 (93%)	1 (4%)	1 (3%)	3 - 6

Tab.9: Darstellung der Isolierungsquoten bei Anwendung des ZSV.

Aus dieser Tabelle wird eine sehr hohe Isolierungsquote mit über 90% antigenpositiven Isolierungen in der I. und auch in der II. Passage ersichtlich. Dagegen schwankten die Isolierungsquoten in den vorherigen Versuchsreihen zwischen 60% - 70% in der I. Passage und 30% - 40% in der II. Passage. Der Antigennachweis gelang in der I. Passage in der Regel zwischen dem 1. und 3. Tag, in der II. Passage zwischen dem 3. und 6. Tag. Mikroskopisch sichtbare Veränderungen glichen denen, die auch bei den Versuchsreihen mit der Inokulationsmethode nach Sato et al. (122) beobachtet wurden, jedoch stellten sie sich schon vom 3. bis 6. Tag ein (Beschreibung siehe Kap.3.2.7.).

Aufgrund der geringen Stuhlprobenanzahl wäre eine zufällige Selektion von 3 besonders adaptionsfähigen Virusstämmen möglich, jedoch wurden von denselben Stuhlproben auch Adaptationsversuche in sämtlichen vorherigen Testreihen durchgeführt, ohne daß eine der 3 Proben durch eine besondere Kultivierungsfähigkeit im Vergleich zu den anderen verwendeten Stuhlproben auffiel.

Im Rahmen des oben beschriebene Zell-Supplement-Verfahrens trat ein bisher nicht beschriebenes Phänomen auf. Einige Rollerkulturen derart infizierter Ansätze produzierten laufend rotapositives Medium, die Zellen starben dabei aber nur in sehr geringer Zahl ab. Ohne weitere Manipulationen an den Kulturen, außer drei bis viertägigem Mediumwechsel wurden 30 - 40 Tage lang stark infektiöses Medium gebildet (siehe Abb.12 und Abb.13). Mit Manipulation, z.B. weitere Einsaaten frisch trypsinierten Zellen konnte das Überleben einzelner Kulturen bis auf 120 Tage verlängert werden (siehe Abb.14). Interessanterweise zeigte sich nach Zugabe von frisch trypsinierten Zellen fast immer ein rasanter Anstieg der Antigenmengen bei den folgenden Mediumwechseln, der sich nach einigen Tagen wieder zurückbildete. Sämtliche weitere Passagen derartig modulierter Kulturen zeigten dasselbe Verhalten (Abb.14). Von drei mit dem veränderten Inokulationsmodus angesetzten Stuhlproben trat bei zweien, die in der PAGE Viren vom L-Typ enthielten (Stuhlprobe 806 und Stuhlprobe 12433), dieses Verhalten auf. Die Stuhlprobe 806 wurde bis in die IX. Passage geführt, wobei der zeitliche Ablauf der Infektion in jeder Pas-

sage dem in Abb.12 exemplarisch dargestellten glich. Nach der IX. Passage wurde keine weiteren Passagierungen mehr unternommen. Die Probe 12433 verhielt sich in der Gewebekultur analog zur Probe 806. Passagierungen der Stuhlprobe 12433 wurden nach Erreichen der VI. Passage eingestellt. Die Isolationsversuche der dritten Probe (6849), die ein Virus des S-Typen enthielt, führten nicht zu dem oben beschriebenen "persistierenden" Verhalten. Diese Stuhlprobe wurde mit dem Zell-Supplement-Verfahren weiter bis in die VII. Passage geführt, ohne daß es zu einem Abbrechen der Passagierbarkeit kam. Danach wurden keine weiteren Passagierungen mehr vorgenommen. Isolierungsversuche, die zuvor mit der Methode nach Sato et al. (122) durchgeführt worden waren, führten nach Erreichen der IV. Passage zu einem Abbruch der Passage. Die unterschiedlichen Resultate der vergleichweisen Isolierung der Stuhlprobe 6849 nach der Methode Sato et al. (122) und dem Zell-Supplement-Verfahren sind in den Tabellen 10 und 11 einander gegenübergestellt.

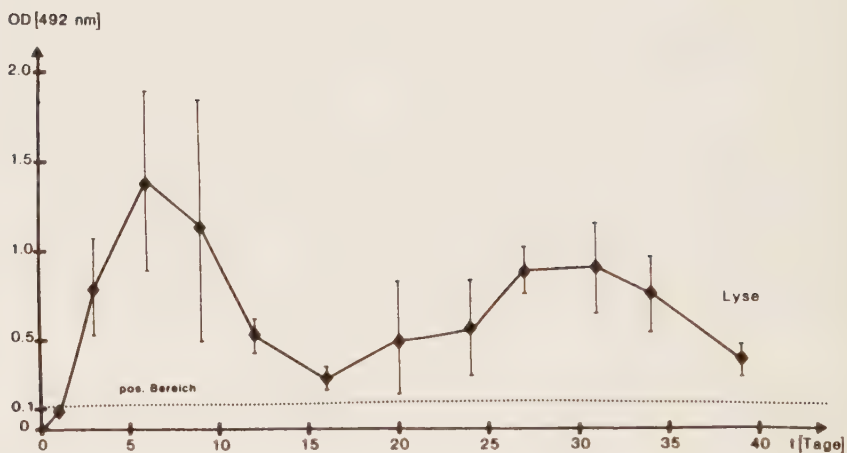


Abb.12: Verhalten der "P" Kultur der Stuhlprobe 806 in IX. Passage auf Ma 104 Zellen. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der OD des Mediums im HRV Antigentest über 40 Tage nach der Inokulation. Die dargestellte Kurve entspricht dem Mittelwert aus 4 inokulierten Kulturen mit einfacher Standardabweichung. Der Grenzwert der Positivität schwankt je nach Testansatz zwischen 0,075 und 0,125. Werte über 0,125 sind als sicher positiv anzusehen. Mit dem Begriff "Lyse" ist die Zerstörung des Zellrasens und das Ende der Antigenproduktion umschrieben.

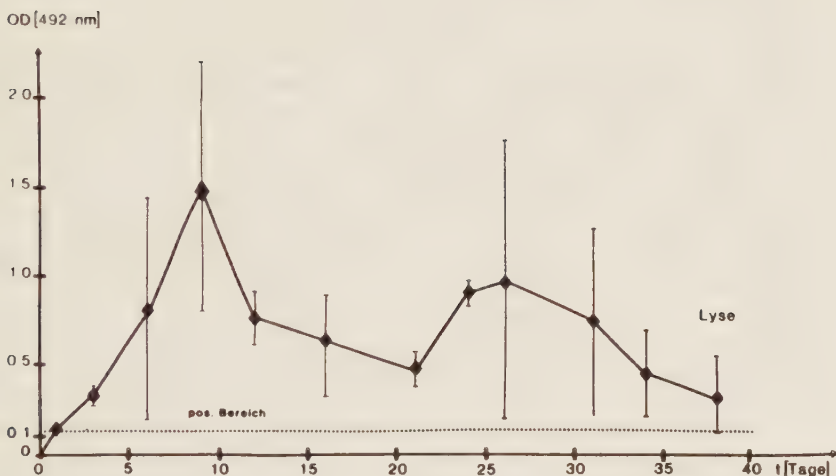


Abb.13: Verhalten der "P" Kultur der Stuhlprobe 12433 in VI. Passage auf Ma 104 Zellen. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der OD des Mediums im HRV Antigentest über 40 Tage nach der Inokulation. Die ermittelte Kurve entspricht dem Mittelwert aus 4 inokulierten Kulturen mit einfacher Standartabweichung. Der Grenzwert der Positivität schwankt je nach Testansatz zwischen 0,075 und 0,125. Werte über 0,125 sind als sicher positiv anzusehen. Mit dem Begriff "Lyse" ist die Zerstörung des Zellrasens und das Ende der Antigenproduktion umschrieben.

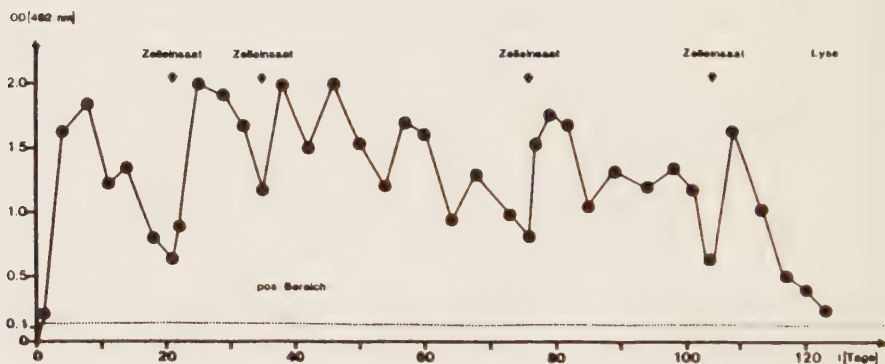


Abb.14: Verhalten der "P" Kultur der Stuhlprobe 806 auf Ma 104 Zellen bei weiteren Zelleinsaaten über einen Beobachtungszeitraum von 125 Tagen post infectionem. Der Grenzwert der Positivität schwankt je nach Testansatz zwischen 0,075 und 0,125. Werte über 0,125 sind als sicher positiv anzusehen. Mit dem Begriff "Lyse" ist die Zerstörung des Zellrasens und das Ende der Antigenproduktion umschrieben.

Passage höhe	Antigen/OD - Mittelwert gebildet aus n pos. Ansätzen	Antigen pos. nach n Tagen
I	0,43	3
II	0,14	3
III	0,13	2
IV	0,14	1
		5
		4
		11
		13

Tab.10: Isolierung der Probe 6849 (S-Typ) nach der Methode Sato.

Passage höhe	Antigen/OD - Mittelwert gebildet aus n pos. Ansätzen	Antigen pos. nach n Tagen
I	0,28	4
II	0,21	4
III	0,27	4
IV	0,26	3
V	0,31	3
VI	0,27	3
VII	0,23	3
		3
		6
		8
		7
		6
		6
		6

Tab.11: Isolierung der Probe 6849 (S-Typ) nach dem ZSV.

Um abzugrenzen, ob der aufgetretene "P"-Effekt auf genetischer Variation der Proben oder dem geänderten Inokulationsverfahren beruht, wurden mit dem ZSV primärisolierte Proben der "P"-Kulturen der Stuhlprobe 806 bei der II. Passageisolierung vergleichend nach der Methode von Sato et al. (122) und dem Zell-Supplement-Verfahren kultiviert. Für beide Versuchsreihen wurden je 4 Ansätze aus einem antigenpositiven Primärisolat inokuliert. Beide Testreihen wurden 30 min. lang mit 20 µg/ml Trypsin bei 37° C vortrypsiniert. Das Erhaltungsmedium beider Versuchsreihen bestand aus MEM, 3% Bicarbonat, 1% NEAA, 10% TPB, 4 µg/ml Trypsin, Penicillin und Streptomycin. Der Mediumwechsel erfolgte bei beiden Testreihen am jeweils gleichen Tag.

Dabei zeigte es sich, daß bei der Isolierung nach Sato et al. (122) das gleiche persistierende Verhalten auftrat, jedoch blieben die ermittelten OD-Angaben weit unter denen mit dem ZSV erhaltenen OD-Angaben zurück (siehe Abb.15).

Die in dieser Vergleichsisolierung beobachteten deutlich höheren OD-Werte von Proben, die nach dem ZSV inokuliert worden waren, konnten auch bei allen anderen "P"-Kulturen in jeder Passage sowohl bei der Primärisolierung, als auch in allen Passageisolierungen, im Vergleich zu den unter dem Verfahren nach Sato et al. (122) ermittelten OD-Werten beobachtet werden. Während sich die antigenpositiven Isolate in den nach Sato et al. (122) kultivierten Proben um eine OD von 0,3 einpendelten, hatte die mittlere OD der "P"-Kulturen Werte um 0,7-0,8 (siehe Abb.15).

Betrachtet man die insgesamt gebildete Antigenmenge, ist ebenfalls eine erhebliche Steigerung bei den "P"-Kulturen zu bemerken. Man erhält in einem durch 3 maliges Einfrieren und Auftauen gewonnenen Extrakt einer nicht "P"-Kultur 2 ml rotazyme-positive Kulturflüssigkeit. Bei einer "P"-Kultur mit einer Lebensdauer von 30 - 40 Tagen und folglichem ca. zehnmaligen Mediumwechsel erhält man das zehnfache Volumen eines höherpositiven Extrakts, was in Hinblick auf weitere Versuche, z.B. PAGE von großem Vorteil ist.

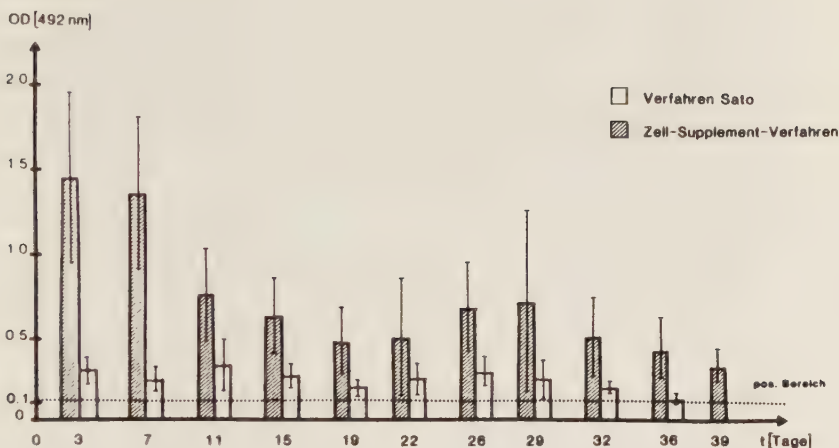


Abb.15: Vergleich der Isolierungen der primärisolierten "P"-Kultur der Stuhlprobe 806 mit dem Verfahren Sato und Zell-Supplement-Verfahren in der folgenden Passageisolation auf Ma 104 Zellen. Die dargestellten Säulen entsprechen dem OD-Mittelwert aus je 4 angesetzten Kulturen mit einfacher Standardabweichung. Der Grenzwert der Positivität schwankt je nach Testansatz zwischen 0,075 und 0,125. Werte über 0,125 sind als sicher positiv anzusehen.

3.2.6 Verhalten antigenpositiver Kulturoisolierungen in der PAGE

Der Nachweis typischer Rotavirus-RNA aus antigenpositiven Primär-, bzw. Passageisolierungen in der PAGE gelang in dieser Arbeit nur bei den hochpositiven Proben der "P"-Kulturen. Bei diesen konnte typische Rotavirus-RNA direkt aus einer gewonnenen Mediumprobe extrahiert werden. Dabei wurde bei geringen Materialmengen (0,2 ml - 0,5 ml einer antigenpositiven Mediumprobe) nach der Methode von Herring et al. ((61) siehe Kap.2.2.1.2), bei großen Materialangebot (2 ml einer antigenpositiven Mediumprobe) nach der Methode von Theil et al. ((137) siehe Kap.2.2.1.1) vorgegangen. In Abb.16 sind die Genome der in der Gewebekultur primärisolierten Stuhlproben 806 und 12433 neben deren Originalstuhlproben zu sehen. In Abb.17 sind die RNA-Banden der gewebe-kulturadaptierten Proben 806 in der IX. Passage und 12433 in der VI. Passage gezeigt. Die Darstellung des Genoms des gewebe-kulturadaptierten S-Typs 6849 gelang nicht.

Ebenso konnte bei antigenpositiven Primär- und Passageisolierungen, die nach der Methode von Sato et al. (122) unternommen worden waren, sowohl mit der Methode nach Herring et al. (61), als auch mit der Methode nach Theil et al. (137) kein RNA-Nachweis in der PAGE geführt werden. Damit gelang bei keiner abgebrochenen Passage ein RNA-Nachweis in der PAGE.

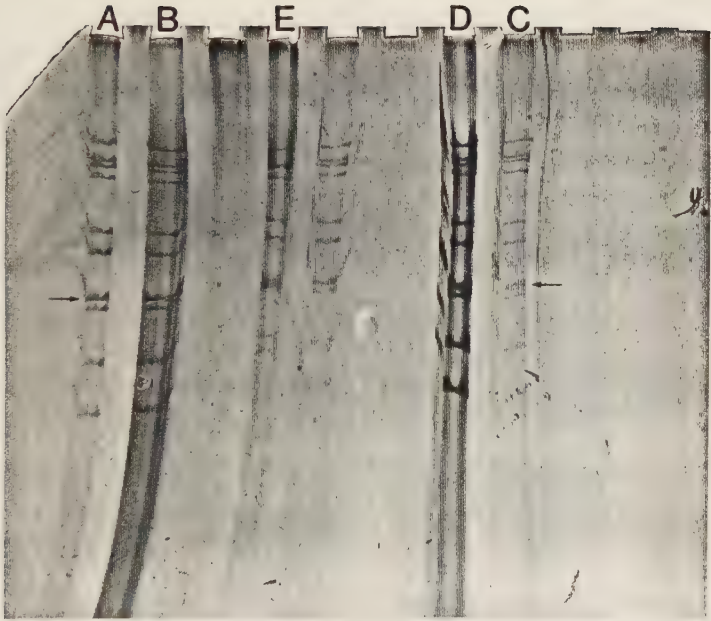


Abb.16: Gelelektrophorese der gewebeкультурadaptierten HRV Proben 806 (A) und 12433 (C) in der I Passage. Daneben Originalstuhlproben 806 (B), 12433 (D) und S-Typ 6849 (E).

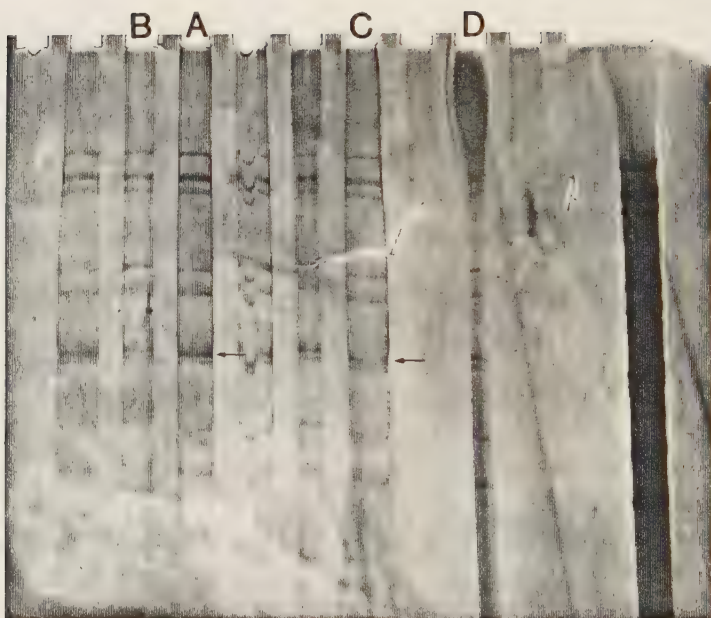


Abb.17: Gelelektrophorese der gewebekulturadaptierten Proben 806 (A) in der IX Passage und 12433 (C) in der VI Passage.
Daneben Originalstuhlproben 806 (B) und 12433 (D).

3.2.7 Mikroskopische Veränderungen der Zellkulturen

Mikroskopisch liessen sich während der Versuche folgende Veränderungen an den Kulturen beobachten. In den Kulturverfahren nach Sato mit den jeweils abgeänderten Versuchsansätzen zeigten sich im Vergleich zu nicht infizierten Gewebekulturen (Abb.18) bereits in der I. Passage nach 5 bis 8 Tagen diskrete Veränderungen. Diese bestanden hauptsächlich in einem Unschärferwerden der Zellgrenzen und Ballonierung einzelner Zellen, gefolgt von einer pyknotischen Zellnekrose. 1 bis 2 Tage später traten auch lytische Foci in geringer Zahl auf. Bei Isolaten, die in höhere Passagen geführt werden konnten, zeigte sich dasselbe Bild, jedoch mit zunehmender Passagehöhe mehr und mehr abgeschwächt. Teilweise traten nach 3 - 4 Tagen auch verklumpte Zellhaufen mit Zellverschmelzungen auf, die denen der Abb.19 glichen. Die Zellveränderungen waren jedoch nicht so ausgeprägt, daß sie ohne Antigennachweis als sicheres Indiz für eine Infektion der Kultur gewertet werden konnten.

Etwas anders war das Verhalten der "P"-Kulturen. Hier trat nach 1 - 3 Tagen ein den gesamten Zellrasen erfassender CPE auf, dessen Hauptmerkmal eine Granulierung des Zytoplasmas war (siehe Abb.20). Diese Erscheinung schwächte sich innerhalb von 3 - 4 Tagen mehr und mehr ab; zugleich bildeten sich lytische Foci in größerer Zahl aus, an deren Grenzen sich aktive Zonen bildeten, die sich mit Zellabrundung und Zellverschmelzung weiter in den Zellrasen vorarbeiteten (siehe Abb.21). Dieses Stadium dauerte ca. 25 - 30 Tage an, in denen der Anteil des nichtbefallenen Zellrasens kontinuierlich abnahm, bis nur noch einzelne kleine Zellinseln (siehe Abb.22) verblieben. Diese wurden nach weiteren 5 - 10 Tagen vollständig zerstört und lösten sich vom Untergrund ab. Danach kam es zu keiner weiteren Antigenbildung mehr. Dieser Vorgang wurde unter dem Begriff "Lyse" definiert.

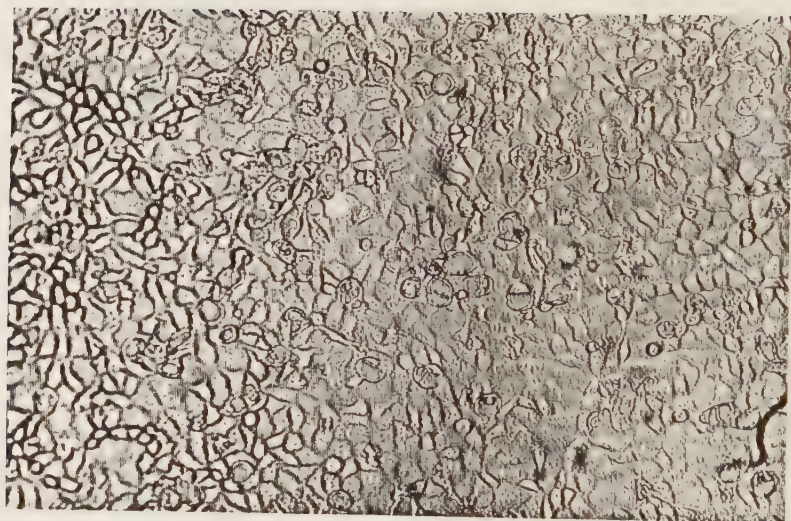


Abb.18: Zellbild der Negativkontrolle.

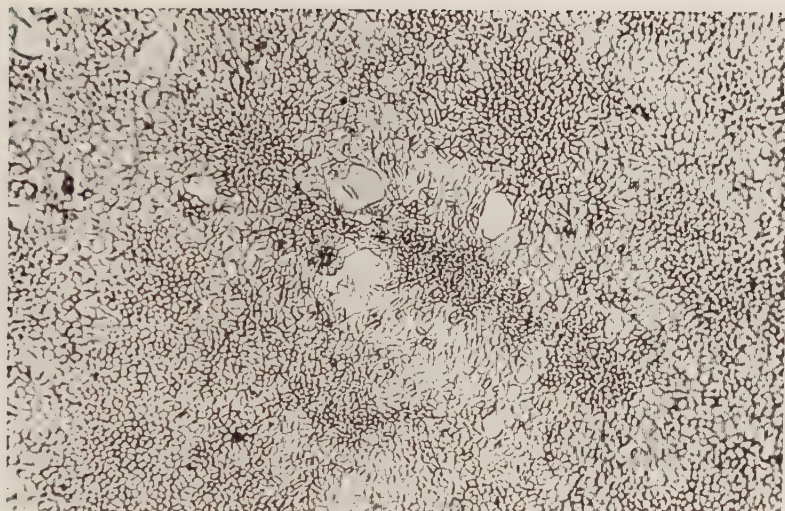


Abb.19: Lokaler CPE bei Isolierungen nach Verfahren Sato.

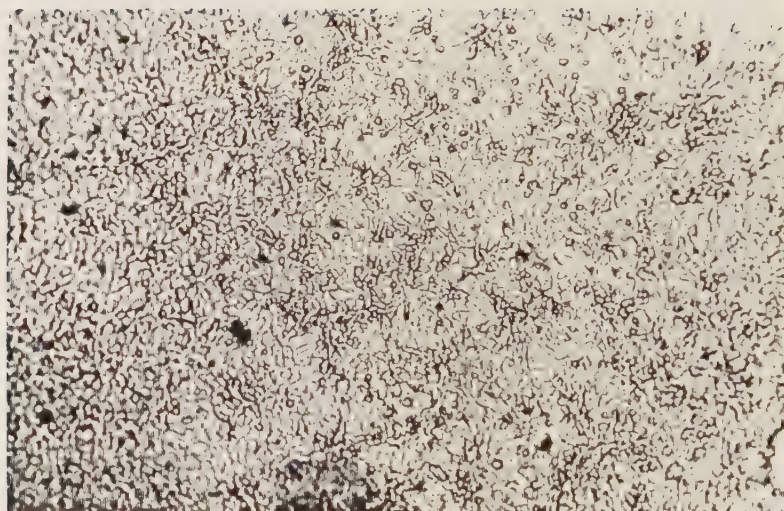


Abb.20: Generalisierter CPE bei "p"-Kulturen.

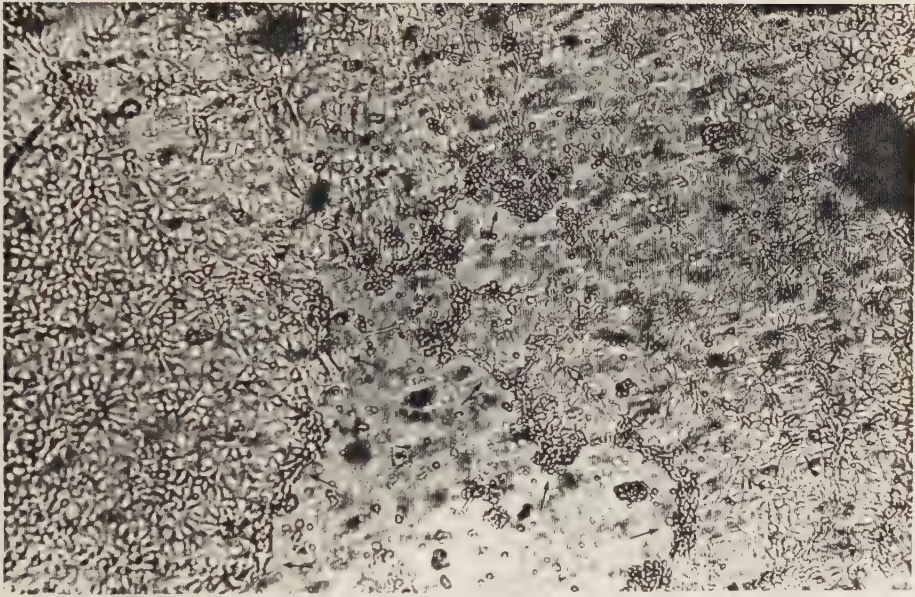


Abb.21: Bildung lytischer Foci und Fortschreiten des CPE
bei "P"-Kulturen.

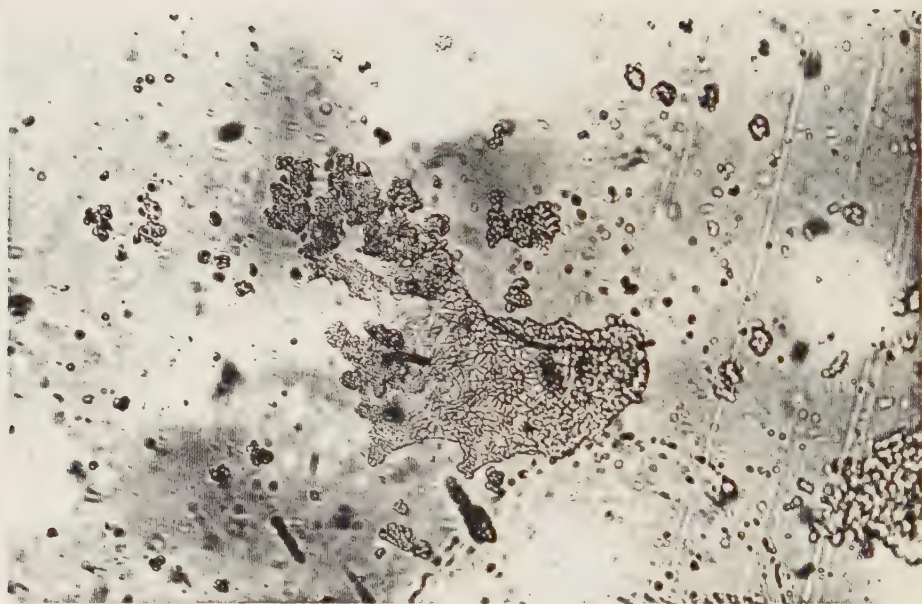


Abb.22: Restzellinseln bei "P"-Kulturen nach 35-40 Tagen.

4. Diskussion

4.1 RNA-Analyse und Epidemiologie

Aufgrund der RNA-Analyse von 58 rotazyme-positiven Proben bezüglich ihres Verhaltens in der Gelelektrophorese ist keine eindeutige Korrelation zwischen Höhe der OD und der Stärke der in der PAGE sichtbaren RNA-Banden festzustellen. Dies mag an der quantitativ ungenauen Methode der Stuhlprobenaufbereitung bei der RNA-Extraktion liegen (Mengen zwischen 0,5 g - 1,0 g). Jedoch deutet sich eine schwache Beziehung zwischen ansteigender OD-Höhe und RNA-Gehalt an, wie es Follet et al. (49), der eine positive Korrelation zwischen Höhe der OD und Anzahl der Viruspartikel fand, beschreibt. Als untere Nachweisgrenze rotazyme-positiver Proben in der PAGE scheint ein OD-Wert zwischen 0,3 und 0,4 in Frage zu kommen, was auch durch die im Rotazyme ELISA niedrig positive, in der PAGE negative Probengruppe angedeutet wird. In dieser Gruppe, die alle rotazyme-grenzwertigen Proben und 5 niedrig positive Isolate (OD 0,15 - 0,28) enthält, wurde keine RNA nachgewiesen. Jedoch könnte sich hinter dieser Gruppe auch ein unspezifisch positives Ergebnis im Rotazyme-ELISA, wie es von Dolan et al. (34) und Chrystie et al. (25) bei relativ niedrig-positiven Stuhlproben beschrieben wird, verbergen.

Auffallend sind die Proben, deren RNA-Nachweis in der PAGE negativ verlief, die aber im Rotazyme-Test hohe OD-Werte (0,9 - 2,0) aufwiesen (7 Proben). Hier scheint das negative Ergebnis am ehesten mit der von verschiedenen Autoren beschriebenen Meinung erklärlich, daß es sich hierbei um Virushüllpartikel ohne Nukleinsäure bzw. Virusdebris, deren Kapselproteine im ELISA nachgewiesen werden, handelt (Rubenstein et al. 117, Dolan et al. 34). Wegen der Höhe der OD handelt es sich vermutlich nicht um falsch positive Rotazyme-Ergebnisse, wie sie von Dolan et al. (34) und Chrystie et al. (25) bei niedrigpositiven bzw. grenzwertigen Proben vermutet wurden.

Hinsichtlich der 33 rotazyme-negativen Stuhlproben, deren PAGE ebenfalls negativ ausfiel, wird klar, daß sich in dem unter-

suchten Kollektiv keine durch den Rotazyme-Test nicht erfaßbare, aber in der PAGE nachweisbare Rotaviren befanden. Dies schließt auch atypische Rotaviren ein, deren Genom in der PAGE nachweisbar sein müßte. Ursache dafür ist wohl der zu geringe Stichprobenumfang. So schwankt die Prozentzahl atypischer Genomprofile in der Literatur zwischen 0,6% und 4% (101, 33). Auf der anderen Seite könnten auch keine atypischen Rotaviren während des Untersuchungszeitraumes im Raum Bayern vorhanden gewesen sein.

In dem Beobachtungszeitraum von 1 $\frac{1}{2}$ Jahren herrschte ein bestimmter Genomtyp, und zwar ein L-Typ, vor. Er fand sich in 37 von 46 positiven Isolierungen, was einer Häufigkeit von 80% entspricht. Eine gleich hohe Prävalenz eines einzelnen Genomtypen beschreibt Houly et al. (64) in einer 4-Jahresstudie in Bochum. Andere Autoren berichten ebenfalls über ein bevorzugtes Auftreten eines Genomprofiles während Beobachtungszeiträumen von 1 - 4 Jahren. Fast immer handelt es sich um L-Typen, die bis auf wenige Ausnahmen anscheinend weltweit dominant sind, wie Berichte aus Australien (124, 114), Mexiko (37, 38), Japan (139), Indonesien (4), Schottland (50), Frankreich (80, 101), Chile (130) und Kenia (24) in den letzten Jahren belegen. Eine Ausnahme stellen einige Berichte über das Überwiegen von S-Typen bei lokalen Epidemien in Mexiko (37), Neuguinea (5) und den West Midland Inseln (121) dar.

Vergleicht man die in dieser Arbeit ermittelten Daten mit denen, die Büttner (23) im Zeitraum von Dezember 1982 bis April 1983 fand, zeigt sich, daß auch hier L-Typen Genomprofile deutlich überwogen (78%). Das am häufigsten vorkommende Genomprofil war ebenfalls der Typ 1b 2a 3e 4/II mit 7 von 22 Isolatzen, was 32% entspricht. Jedoch trat ein anderer Genomtyp (1b 2b 3e 4/II) mit einer annähernd gleichen Häufigkeit von 6/22 Proben (27%) auf. Genau dieser Elektrophorese-Typ blieb in Bochum vier Jahre lang mit einer Prävalenz von 80% (64) stabil, während er in Bayern von Februar 1983 bis September 1984 nur einmal 1/46 (2%) isoliert werden konnte. Damit kann vermutet werden, daß zumindest im Raum München ein Wechsel des vorherrschenden Genomtyps innerhalb der L-Typen stattgefunden hat, indem der Typ 1b 2a 3e 4/II deutlich

zunahm, während 1b 2b 3e 4/II nur noch sporadisch auftrat. Auch dieses Ergebnis wird durch andere Autoren bestätigt, die ein kontinuierliches Überwiegen von Viren der L-Klasse beschreiben, aber einen Wechsel des vorherrschenden Elektrophorese-Typen innerhalb der L-Klasse während zeitlich getrennten Epidemien beobachten konnten (34, 124).

Der Anteil von S-Typen betrug bei Büttner (23) 22% in dieser Arbeit 11%. Houly et al. (64) ermittelte 13% S-Typen bei seiner Studie in Bochum. In dieser Größenordnung bewegt sich der Anteil von S-Typen in anderen epidemiologischen Studien, bei denen L-Typen überwogen so z.B. aus Mexiko (37) 11%, aus Washington D.C.(147) 23%, aus Ägypten (98) 28%, aus Venezuela (143) 14% und aus Kenia (24) 27% bzw.4%.

Betrachtet man die Ergebnisse von Seiten der einzelnen Kliniken, so ergeben sich zwei gegensätzliche Positionen. Auf der einen Seite die Kinderpoliklinik in München, in der unter 10 Proben 5 verschiedene Genomprofile nachgewiesen werden, auf der anderen Seite das Krankenhaus Schweinfurt, in dem unter 15 untersuchten Isolaten ein und derselbe Genomtyp auftritt. Dazwischen liegen die anderen Kliniken, in denen ein Prävalenztyp auftritt und sporadisch andere Genomprofile auftauchen. Das Verhältnis unterschiedlicher Isolate zur Zahl untersuchter Proben ist in der Poliklinik am höchsten. Interessanterweise berichtet auch Büttner (23) über ähnlich viele Genomvarianten im Vergleich zur Probenzahl (6/16). Als Erklärung kann einerseits die hohe Patientenfluktuation, andererseits das in Bezug auf seine Populationsdichte großstädtische Einzugsgebiet mit seiner hohen Populationsfluktuation, wodurch immer wieder neue Genomtypen eingeschleppt werden können, dienen.

Das alleinige Auftreten eines Genomtypen in Schweinfurt läßt die Vermutung aufkommen, daß es sich hier hauptsächlich um eine nosokomiale Infektion handelt. Endemische Situationen wurden in Neugeborenenstationen trotz Beachtung der hygienischen und der Desinfektionsmaßnahmen beobachtet (persönliche Mitteilung Prof. Frösner). Außerdem sind asymptomatische Rotavirusinfektionen und Ausscheidung unter Kindern wie Erwachsenen bekannt (Barron-Romero

et al.(12)). So erscheint es nicht unwahrscheinlich, daß unter dem Personal asymptomatische Virusträger ermittelt werden können, durch die über Infektion und Reinfektion der ermittelte Genomtyp endemisch gehalten wird. Zusätzlich kann in diesem kleinstädtischen, bzw. ländlichen Einzugsgebiet eine wesentlich geringere Populationsfluktuation im Vergleich zu München vermutet werden, sodaß die mögliche Einschleppung neuer Genomtypen und die dadurch bedingte Variation der Genomprofile als wesentlich geringer als in München anzusehen ist.

4.2 Viruskultivierung

Die Anzüchtung von Rotaviren war lange Zeit mit großen Schwierigkeiten behaftet (siehe Kap.1.7), bis entdeckt wurde, daß Trypsin einen positiven Effekt auf die Isolierung dieser Viren hat (83). Daraufhin wurden die Interaktionen zwischen Rotaviren, Trypsin und dem Zellmonolayer zum Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (8, 11, 21, 26, 28, 39, 41, 54, 92, 136). Diese Experimente zeigten, daß Trypsin das Verhältnis zweier, zuerst von Bridger und Woode (21) beschriebener Rotaviruspartikel in der Gewebekultur veränderte. Diese beschrieben die Existenz elektronenmikroskopisch "glatter", infektiöser Partikel, auch L-Partikel genannt, mit einer Dichte von 1,36 g/ml im CsCl-Gradienten und "rauher", nicht infektiöser Partikel mit einer Dichte von 1,38 g/ml (D-Partikel). Diese Beschreibung wurde auch von anderen Autoren bestätigt (13). Clark et al. (27) zeigte, daß die Trypsinbehandlung des Virus bei der Inokulation das Verhältnis von D- und L-Partikeln zugunsten der infektiösen L-Partikel veränderte.

Den genauen Wirkungsmechanismus konnten Clark et al. (28) und Estes et al. (41) anhand von Versuchen mit dem Affenstamm SA-11 und dem bovinen UK-Stamm nachweisen. Trypsin spaltet eines der äußeren Hüllproteine des Virus in zwei Abbauproteine, deren Anstieg mit einer Zunahme der Infektiosität korreliert, und aktiviert somit das Virus direkt. Graham und Estes (54) zeigten, daß die Vorbehandlung des Virusinokulums mit Trypsin zu einer deutlichen Infektiositätssteigerung im Vergleich zu nicht trypsinierten Viren führt. Auch während des Kulturansatzes steigert die Trypsinbehandlung die Virusausbeute und zwar zu Beginn der Infektion und während die ersten in der Gewebekultur gebildeten Partikel ins Medium entlassen werden (z.B. bei SA-11 nach ca. 10 h (54)). Clark et al. (28) zeigte, daß die Trypsinbehandlung auch die virale RNA-Synthese in infizierten Zellen nahezu verdoppelt im Vergleich zu unbehandelten Fraktionen. Suzuki et al. (134) bewies, daß Trypsin auch bei dem Eintritt des Virus in die Zelle eine Rolle spielt. Trypsinierte Viren können die Zelle unverän-

dert penetrieren, während untrypsinierte Viren beim Eintreten in die Zelle von Lysosomen aufgenommen werden und somit nicht mehr an der Infektion beteiligt sind.

So wurden Methoden zur Viruskultivierung entwickelt bzw. weiterentwickelt, die die gewonnenen Erkenntnisse zur Anwendung brachten. Trypsin wurde demzufolge bei der Vorbehandlung des Inokulums und im Erhaltungsmedium in verschiedenen hohen Konzentrationen eingesetzt (siehe Kap. 2.4). Um zu prüfen, ob variable Dosierungen bei der Vortrypsinierung zu unterschiedlichen Ergebnissen führten, wurden in dieser Arbeit vergleichende Ansätze mit variablen Trypsinkonzentrationen unternommen. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Steigerungen der Isolierungsquoten bei ansteigender Trypsindosierung.

Bei der Anwendung verschieden hoher Trypsinkonzentrationen im Erhaltungsmedium wurden ebenfalls ähnliche Ergebnisse erzielt. Zwar zeigt sich eine deutliche obere Grenze der Trypsinkonzentration bei 8-10 $\mu\text{g/ml}$, über der mit toxischen Trypsinnebenwirkungen auf den Zellrasen gerechnet werden muß, jedoch wurden im nebenwirkungsfreien Bereich von 1-8 $\mu\text{g/ml}$ keine signifikanten Verbesserungen erzielt. Diese Resultate werden durch die Befunde von Graham und Estes (54) unterstrichen, die bei Versuchen mit unterschiedlichen Trypsinkonzentrationen im Erhaltungsmedium eine Kurve ermittelten, die bis zu einer Trypsindosis von 1 U/ml steil ansteigt und danach ein Plateau erreicht, was bei dem verwendeten Trypsin einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ entsprach. Auch Clark et al. (26) erhielt eine ähnliche Kurve mit steilem Anstieg bis 1 U/ml und nachfolgendem Plateau. Hierbei war für die benötigte Enzymaktivität von 1 U/ml eine Trypsinkonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ nötig. Zieht man die Ergebnisse von Offit et al. (102) zum Vergleich heran, weisen diese sehr hohe Trypsinkonzentrationen sowohl bei der Vortrypsinierung (40 $\mu\text{g/ml}$), als auch im Erhaltungsmedium (40 $\mu\text{g/ml}$) auf, eine Dosierung, die sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten Trypsin als toxisch erwies. Das von Offit et al. (102) verwendete Trypsin hatte allerdings eine relativ niedrige spezifische Aktivität.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß eine Trypsinbehandlung, sowohl bei der Vorbehandlung als auch im Erhaltungsmedium, bei der Isolation von Rotaviren als notwendig betrachtet werden kann, jedoch kann ab einer Schwellendosis von etwa 1 U/ml keine weitere Steigerung der Infektiosität mehr erreicht werden. Dennoch sollten vor Isolierungsversuchen von Rotaviren Konzentrationsversuche unternommen werden, um die optimale Dosierung des verwendeten Trypsins zu ermitteln, da die meist angewandte Methode die Trypsindosierung allein in $\mu\text{g/ml}$ anzugeben ein unscharfes Maß für die spezifische Aktivität des verwendeten Enzyms ist.

Der Vergleich zwischen dem Inokulationsverfahren nach Sato et al. (122) (Verfahren A), bei dem nach einstündiger Adsorption das Inokulum ausgewaschen wird, und der Versuchsanordnung nach Hasegawa et al. (60) (Verfahren B), die ein Belassen des Inokulums nach 1 h Adsorptionszeit vorsieht, zeigte in den ersten beiden Passagen einen geringen Vorteil für das Verfahren B. Doch bei der Fortführung dieser Versuche in höhere Passagen wurde ersichtlich, daß die nach Verfahren B infizierten Kulturen nicht über die zweite Passage hinaus in Kultur gehalten werden konnten.

Als mögliche Erklärung hierfür kann ein Blockadeeffekt verbliebener, nicht infektiöser Partikel vermutet werden. Während bei Verfahren A nicht adsorbierte defekte Partikel nach einer Stunde entfernt werden, verbleiben bei Verfahren B derartige Partikel in der Kultur. Somit können diese mit den von infizierten Zellen neu gebildeten Partikeln, die nach 5 - 6 h ausgeschleust werden und deren Produktion in mehreren infektiösen Zyklen bis 40 h andauern kann (102), bei der Passage in neue Zellkulturen um Virusrezeptoren der noch nicht infizierten Zellen konkurrieren. Dabei sind jedoch infektiöse Partikel quantitativ weit unterlegen, wie Ergebnisse von anderen Autoren belegen. So zeigt Graham et al. (54), daß nicht alle vollständigen Viruspartikel infektiös sind. Ward et al. (142) konnte in quantitativen Versuchen zeigen, daß nur eines von 46000 in Ma 104 Zellen gebildeten Rotaviruspartikeln infektiös ist. Angesichts derartiger zahlenmäßiger Überlegenheit nicht infektiöser Partikel ist eine zunehmende Ausdünnung

infektiöser Partikel während mehrerer aufeinanderfolgenden Passagen vorstellbar. In diese Richtung weisen auch die Ergebnisse der in der Gewebekultur isolierten Stuhlproben hin, deren RNA in der PAGE untersucht wurde. Hierbei konnte bei antigenpositiven Proben von abbrechenden Passagen keine RNA in der PAGE nachgewiesen werden. Dies spricht vermutlich ebenfalls für ein Überwiegen nichtinfektiöser Partikel, deren Antigen zwar im ELISA nachgewiesen werden konnte, die aber wahrscheinlich aufgrund unvollständiger intrazellulärer Reifungsvorgänge keine bzw. nicht genügend infektiöse RNA enthielten, sodaß sie bei weiteren Passagen die Infektion nicht aufrecht erhalten konnten und es zum Abbruch der Passage kam.

Eine zweite Möglichkeit wäre die Blockade infektiöser Partikel durch inhibitorische Stuhlfaktoren (lokale Antikörper) im Inokulum, die bei Nichtentfernung den infektiösen Zyklus beeinträchtigen könnten, und somit ebenfalls zu einer Ausdünnung infektiöser Viruspartikel führen würden.

Ein andere Infektionsbehinderung könnte durch eine mögliche Interferoninduktion in den verwendeten Zellen durch defekte Partikel im verbliebenen Inokulum verursacht werden. Das gebildete Interferon würde eine weitere Virusreplikation verhindern und zu einem Erliegen der Infektion führen.

Jedoch scheinen die beiden letztgenannten Möglichkeiten von nachrangiger Bedeutung zu sein, da Rotaviren zwar gute Interferoninduktoren sind, aber nur dann zu einer signifikanten Interferonbildung führen, wenn sie vorher mit UV-Licht bestrahlt wurden, bzw. die Zellen vorher selbst mit Interferon behandelt wurden (McKimm-Breschkin (87)). Ferner könnten proteinartige fäkale Hemmfaktoren, wie z.B. IgA, durch das im Inokulum und im Erhaltungsmedium vorhandene Trypsin angedaut und damit inaktiviert werden. So ist als wahrscheinlichster Nachteil des Verfahrens B die erstgenannte Hypothese anzusehen.

In einem anderen Versuchsansatz wurde die Isolierungsquote hinsichtlich der Verwendung des Mediumzusatzes Tryptose-Phosphat-Lösung (TPB), einem Pepton, geprüft. Hierbei zeigte sich mit

steigender Passagehöhe eine deutliche Verbesserung der Passagefähigkeit, sowohl in Hinblick auf die Anzahl positiver Kulturen, als auch hinsichtlich der erreichten Passagehöhe. Durch dieses Ergebnis kann vermutet werden, daß die Verwendung von TPB die zelluläre Syntheseleistung viraler Funktionskomponenten in gewissem Rahmen zu steigern vermag, sodaß insgesamt eine Verbesserung der Passagefähigkeit möglich ist. Auch Ginsberg et al. (52) konnte bei der Anwendung von 10% - 15% TPB bei der Züchtung von Poliomyelitisviren auf HeLa-Zellen eine deutlich größere Virusausbeute erzielen als ohne TPB-Verwendung. So stellte er fest, daß bei TPB-Zusatz die Zellen eine bessere virus-cytopathische Sensitivität hatten, und somit bereits geringe Virusmengen zur Zelldestruktion und folgenden Entdeckung führten. Dieser Umstand ist besonders hinsichtlich der bereits erwähnten relativ niedrigen Rate an infektiösen Partikeln von großer Bedeutung.

Betrachtet man die nach dem herkömmlichen Verfahren (122) gewonnenen Ergebnisse im Kontext, kann man feststellen, daß trotz der durch mehrere Autoren belegten erfolgreichen Adaptationsmethoden (60, 75, 122, 140) die Isolierung von humanen Rotaviren problematisch ist. Es konnten zwar von den im ELISA und der PAGE positiven Stuhlproben alle 12 zumindest über eine Passage erfolgreich in der Gewebekultur isoliert werden, trotzdem gelang es nicht einen Stamm unter diesen Kultivierungsmethoden vollständig zu adaptieren. Zu ähnlichen Ergebnissen kam Naguib et al. (98) bei der Isolierung von humanen Rotaviren auf Ma 104 Zellen. Von 12 Proben gelang es 11 in der I. Passage zu isolieren und nur 4 in der II. Zudem konnten bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen ähnliche Beobachtungen gemacht werden, wie sie von anderen Autoren zu Beginn der Isolationsversuche von Rotaviren beschrieben wurden. So seien z.B. das mit steigender Passagehöhe einhergehende Ansteigen der Zeitintervalle bis in infizierten Kulturen eigenständig produziertes Antigen nachgewiesen werden konnte (vergleiche Tab.9) (91, 144) und das Absinken der Infektiosität isolierter Proben nach der zweiten Passage, das vermutlich auf der vermehrten Bildung defekter, nicht infektiöser Par-

tikel beruht, genannt (vergleiche Tab.9 (91, 144)).

Einerseits mag dieses Problem darin liegen, daß die verwendete Zelllinie Ma 104 nicht zu den geeignetsten Zellarten für die Adaptation humaner Rotaviren gezählt werden kann. So konnte gezeigt werden, daß auf Ma 104 Zellen im Vergleich zu anderen Zellarten, wie z.B. AGMK, CMK, deutlich schlechtere Isolierungsquoten zu erzielen sind (98, 142). Dies mag an einer verminderten endogenen Produktion infektiöser L-Partikel liegen, wie Clark et al. (27) schrieb, bzw. an einer relativ großen intrazellulären Instabilität neugebildeter L-Partikel in Ma 104 Zellen. Auf der anderen Seite scheinen aber auch deutliche Unterschiede in der Kultivierbarkeit einzelner Rotavirusstämme zu bestehen. So konnte Urasawa et al. (140) 7 von 13 Proben unter gleichen Bedingungen auf Ma 104 Zellen voll adaptieren. Dabei zeigte es sich, daß die einzelnen Stämme unterschiedliche virale Reproduktionsquoten aufwiesen (60% - 90%). Auch Albert und Bishop (6) konnten unter dem von Sato et al. beschriebenen Kultivierungsverfahren (122) von 16 versuchten Isolationen auf Ma 104 Zellen nur 6 Stämme zu kontinuierlichem Wachstum in vitro bringen, was einer Quote von 37% entspricht. Als besonders schwierig erwies sich die Isolierung von S-Stämmen. Zu ähnlich geringen Adaptationserfolgen (insgesamt 20%) kam auch Garbarg-Chenon et al. (51). Genau wie bei Albert und Bishop galt die Isolation von S-Stämmen als besonders schwierig. So waren von 42 versuchten Kultivierungen 28 L-Stämme, von denen es gelang 7 zu adaptieren, was einer Quote von 25% entspricht. Die restlichen 14 Proben waren S-Stämme, von denen nur eine Probe in Kultur gehalten werden konnte. Dies entspricht einer Isolierungsquote von nur 7%. Für eine genetische Komponente als Ursache dieser Kultivierungsunterschiede sprechen auch die Untersuchungen von Kalica et al. (69). Bei Rekombinationsversuchen mit adaptierten bovinen und nicht adaptierten humanen Rotaviren wurde festgestellt, daß die Fähigkeit zur Gewebekulturadaptation von den Genomen 4 und/oder 5 abhängig ist.

Im Vergleich zu den mit konventionellen Isolierungsmethoden ermittelten Ergebnissen konnte durch die in dieser Arbeit vorgenom-

mene Änderung der Inokulation, die in der Verwendung dünn eingesäeter Zellen und zusätzlicher Einsaat frisch trypsinierter Zellen bestand, deutlich veränderte Ergebnisse erzielt werden. Bereits McNulty et al. (89) berichtet über eine vermehrte Zellinfektionsrate bei Verwendung frisch trypsinierter Zellen in Vergleich zu stationären Monolayern. Diese eingesäten Zellen, die zu großen Teilen in den dünn eingesäten Kulturen anwachsen, teilen sich noch und besitzen somit ein für den Wachstumsstoffwechsel nötiges ausgeprägtes RER im Vergleich zu ruhenden Zellen, die nur noch einen Erhaltungsstoffwechsel betreiben. Da aus elektronenmikroskopischen Studien bekannt ist, daß Rotaviren den letzten, für die Infektiosität entscheidenden Reifungsschritt am RER der befallenen Zelle vollziehen (110, 133), wäre es denkbar daß durch die Interaktion der inokulierten Viren mit Zellen, die sich noch im Wachstum befinden, eine wesentlich höhere Produktion vollständig infektiöser Partikel gewährleistet ist, als bei ausgereiften ruhenden Zellen. Somit läge die Menge an neugebildeten und insbesondere an infektiösen Partikeln genügend hoch um die Isolierung erfolgreich fortführen zu können, während es bei geringer Produktion zu einer Ausdünnung infektiöser Partikel und zum Verlust des Virus käme. Diese Hypothese erscheint bei vergleichender Betrachtung der Isolierung des S-Stammes 6849 nach Verfahren Sato (122) und nach dem Zell-Supplement-Verfahren wahrscheinlich. Bei diesem Stamm kam es nach der herkömmlichen Methode zu einem Absinken der Antigenproduktion und zu einem Abbruch der Passagierbarkeit. Dagegen konnte das Virus mit der neuen Kultivierungsmethode kontinuierlich weiterpassagiert werden. (vergleiche Tab.9 und Tab.10).

In der Literatur findet sich bisher kein Bericht über das in dieser Arbeit beobachtete "persistierende" Verhalten von humanen Rotaviren in der Gewebekultur. Dennoch gibt es Erkenntnisse, die dieses überraschende Ergebnis verständlich machen. Es existieren bei Reoviren, zu deren Familie auch die Rotaviren gehören, schon seit geraumer Zeit Berichte über durch Mutationen erworbene neue Eigenschaften, wie z.B. Viruspersistenz und ts-Mutanten (3, 43, 44, 62, 126). Interessanterweise wird in letzter Zeit auch über

ts-Mutanten des simianen Rotavirusstammes SA-11 berichtet (111). Daneben wird atypisches Verhalten humaner Rotaviren in der Gewebekultur beschrieben. So wurden von Agliano et al. (1) acht verschiedene Stämme ohne Vortrypsinierung und Trypsinzusatz im Erhaltungsmedium isoliert und durch das Elektronenmikroskop und Immunfluoreszenzuntersuchungen als Rotaviren identifiziert.

Das in dieser Arbeit beschriebene abnormale Wachstumsverhalten der isolierten Proben ist einer als "carrier-culture" bezeichneten in vitro Persistenz ähnlich. Hierbei wird eine relativ geringe Anzahl von Zellen durch das Virus infiziert und neue Zellen durch die bei der Lysis infizierter Zellen freigesetzten Viren befallen. Die Entstehung einer solchen carrier-Kultur wird sowohl von der Zellart als auch vom Vorhandensein eines bestimmten Stadiums des Zellvermehrungszyklus begünstigt (81, 132). Gerade dieser letztgenannte Faktor kommt bei der hier angewandten Methode zum Tragen. Während bei dem Standardverfahren ein dichter, gleichförmiger Monolayer nach mehrtägigem Heranwachsen infiziert wird, ergeben sich nach der neuen Methode Zellpopulationen in unterschiedlichen Zellstadien. So bilden sich in den verwendeten Rollerkulturen neben den noch wachsenden dünn besiedelten Zellgebieten auch dicht gelagerte, ruhende Zellinseln. Dieser Zustand wird durch die Einsaat weiterer Zellen, die zum Teil noch anwachsen und somit auch verschiedene Zellstadien durchlaufen noch verstärkt. Auch sind frische Zellen vermutlich nicht blockiert und lassen vermehrt Viruspenetration zu, während sie noch wachsen.

Das bei den Versuchen beobachtete drastische Ansteigen der Antigenproduktion bei Einsaat frischer Zellen während der Kultivierung (siehe Abb.14) wird ebenfalls bei in vitro Persistenzen beschrieben. So zeigt sich bei der persistierenden Infektion von Mumpsviren auf humanen Konjunktivazellen eine niedrige Virusausbeute unter normalen Kultivierungsbedingungen. Wird jedoch der Zellrasen überwachsen, kommt es zu einem sprunghaften Anstieg der Virustiter (132).

Ein zusätzlicher Aspekt ergibt sich durch die Beobachtung, daß es bei einer der drei Proben durch die neue Methodik zwar zu einer

deutlichen Steigerung der Passagierbarkeit im Vergleich zu den vorherigen Versuchen kam. Jedoch stellte sich das oben beschriebene persistierende Verhalten trotz mehrfacher Ansätze nicht ein. Bei der erwähnten Probe handelt es sich um einen S-Typen (Probe 6849, vergleiche Tab.9 und Tab.10). Damit weist dieses Ergebnis in die gleiche Richtung wie die Resultate von Albert und Bishop (6) und Garbarg-Chenon et al. (51), die über besondere Probleme bei der Adaptation von S-Stämmen berichten. Der Grund weshalb S-Typen im Vergleich zu L-Genomstämmen schwieriger zu kultivieren sind liegt noch im Unklaren.

Faßt man die ermittelten Ergebnisse der "P"-Kulturen zusammen, kann man folgende Hypothese formulieren:

Primär scheint die Möglichkeit zu derart verändertem Verhalten in der Gewebekultur genetisch bedingt zu sein. So konnten Ahmed und Fields bei Reoviren nachweisen, daß zwei Gene bei der Entstehung und Erhaltung persistierender Infektionen in vitro eine entscheidende Rolle spielen (2). Auf der anderen Seite scheint der geänderten Kultivierungsmethode eine Art Schrittmacherfunktion zuzukommen, da beide Rotavirusstämme unter konventionellen Isolierungsmethoden keine spontane Persistenz entwickelten. Jedoch zeigten beide Isolate nach Entstehung der Persistenz auch unter konventionellen Kultivierungsmethoden dasselbe veränderte Gewebekulturverhalten, allerdings mit deutlich geringerer Virusausbeute (vergleiche Abb.15). Offensichtlich kommt es zu einer Adaptation des Virus an das Kultursystem.

5. Zusammenfassung

Es wurden Versuche zur molekularen Epidemiologie und zum Verhalten humaner Rotaviren in der Gewebekultur durchgeführt. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Bei der Untersuchung von 95 aus verschiedenen Teilen Bayerns stammenden Stuhlproben stellte sich heraus, daß während des Beobachtungszeitraumes 1983/84 ein einziger Elektrophoresetyp mit langem Migrationsverhalten der Segmente 10 und 11 in der PAGE in allen untersuchten Kliniken stark vorherrschend war. Daneben traten andere Genomprofile je nach Klinik mehr oder weniger häufig auf.
2. Das Verhältnis von "short" zu "long"-Typen in rotaviruspositiven Stuhlproben von Patienten mit Durchfall betrug 11% zu 89%.
3. Eine direkte Korrelation zwischen Höhe der OD im ELISA und der relativen RNA-Konzentration in der PAGE ließ sich nicht nachweisen. Der Genomnachweis gelang nur bei im ELISA-Test deutlich positiven Stuhlproben. Der fehlende Genomnachweis in einigen Proben, die im ELISA hoch-positive OD-Werte aufwiesen, kann mit der Bildung von Viruspartikeln ohne Nukleinsäure erklärt werden.
4. Bei der Untersuchung traten atypische Genomprofile, deren Antigennachweis im ELISA nicht gelingt, deren Genom jedoch in der PAGE nachweisbar ist (wie z.B. Pararotaviren), weder in rotaviruspositiven noch in rotavirusnegativen Stuhlproben von durchfallerkrankten Patienten auf.
5. Bei den Untersuchungen zur Kultivierung von humanen Rotaviren zeigte sich, daß eine Erhöhung der Trypsinkonzentration sowohl bei der Vortrypsinierung als auch im Hauptmedium keine Steigerung der Isolierungsquote bewirkt.

6. Der Vergleich der Isolierungsquoten beim Belassen bzw. beim Auswaschen des Inokulums nach der Adsorption, zeigte beim Weiterpassagieren ein Vorteil zugunsten der zweiten Variante.
7. Der Zusatz von Tryptose-Phosphat-Lösung führte zu einer Verbesserung der Isolierungsquote und zu einer Verbesserung der Passagierbarkeit.
8. Die Verwendung dünn eingesäater Rollerulturen mit zusätzlicher Zelleinsaat bei der Inokulation ergab eine deutliche Verbesserung des Kultivierungsverhaltens.
9. Bei den Isolierungsversuchen mit dem letztgenannten Inokulationsverfahren (Zell-Supplement-Verfahren) entwickelte sich bei zwei Rotavirusproben ein bisher nicht beschriebenes persistierendes Verhalten in vitro.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Agliano AM, Rossi A, Sanna A. Isolation from fecal specimens of new strains of human rotavirus primarily cytopathic for stationary cell cultures without trypsin. Arch. Virol. 84:119 (1985)
- (2) Ahmed R and Fields BN. Role of the S4 gene in the establishment of persistent reovirus infection in L-cells. Cell 28:605 (1982)
- (3) Ahmed R, Kauffman RS, and Fields BN. Genetic variation of cold-sensitive and temperature-sensitive mutants from persistently infected L-cells. Virology 131:71 (1983)
- (4) Albert MJ, Soenarto Y, and Bishop R. Epidemiology of rotavirus diarrhea in Yogyakarta/Indonesia, as revealed by electrophoresis of genome RNA. J. Clin. Microbiol. 16:731 (1982)
- (5) Albert MJ, Bishop RF, and Shann FA. Epidemiology of rotavirus diarrhea in the highlands of Papua New Guinea in 1979, as revealed by electrophoresis of genome RNA. J. Clin. Microbiol. 17:162 (1983)
- (6) Albert MJ and Bishop RF. Cultivation of human rotavirus in cell culture. J. Med. Virol. 13:162 (1983)
- (7) Albrey MB and Murphy AM. Rotavirus growth in bovine monolayers. Lancet 1:753 (1976)
- (8) Babiuk LA, Mohammed K, Spence L, Fauvel M, and Petro R. Rotavirus isolation and cultivation in the presence of

trypsin

J. Clin. Microbiol. 6:610 (1977)

- (9) Banatvala JE, Totterdell B, Chrystie IL, and Woode GN. In vitro detection of human rotavirus.
Lancet 2:821 (1975)
- (10) Banatvala JE, Chrystie IL, and Totterdell BM. Rotaviral infections in human neonates.
Am. J. Vet. Med. Assoc. 173:527 (1978)
- (11) Barnett BB, Spendlove RS, and Clark ML. Effekt of enzymes on rotavirus infectivity
J. Clin. Microbiol. 10:11 (1979)
- (12) Barron-Romero BL, Barreda-Gonzales J, Doval-Ugalde R, Zermeno-Eguia J, and Huerta-Pena M. Asymptomatic rotavirus infections in day-care centers.
J. Clin. Microbiol. 22:116 (1985)
- (13) Beards GM. A Method for the purification of rotaviruses and adenoviruses from faeces.
J. Virol. Meth. 4:343 (1982)
- (14) Beards GM, Campell AD, Cottrell NR, Peiris JS, Rees N, Sanders RC, Shirley JA, Wood WC, and Flewett TH. Enzyme-linked immuno sorbent assay based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection.
J. Clin. Microbiol. 19:248 (1983)
- (15) Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, and Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis.
Lancet 2:1281 (1973)
- (16) Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, and Ruck BJ. Detection

of a new virus by electron microscopy of fecal extracts from children with acute gastroenteritis.
Lancet 1:149 (1974)

(17) Black RE, Merson MM, and Hug I. Incidence and sensitivity of rotavirus serotypes and other viral agents associated with pediatric gastroenteritis.
Lancet 1:141 (1981)

(18) Bohl EH, Saif LJ, Theil KW, Agnes AG, and Cross RF. Porcine pararotavirus: Detection and differentiation from rotavirus and pathogenesis in gnotobiotic piglets.
J. Clin. Microbiol. 15:312 (1982)

(19) Brandt CD, Kim HW, and Tolken RH. Comparative epidemiology of the rotaviral serotypes and other viral agents associated with pediatric gastroenteritis.
Am. J. Epidemiol. 110:243 (1979)

(20) Bridger JC and Woode GN. Neonatal calf diarrhea: Identification of a reovirus-like agent (rotavirus) in faeces by immunofluorescence and immune electronmicroscopy.
Br. Vet. J. 131:528 (1975)

(21) Bridger JC and Woode GN. Characterization of two particle types of calf-rotavirus.
J. Gen. Virol. 31:245 (1976)

(22) Bridger JC, Clarke IN, and McGrae MA. Characterization of an antigenically distinct porcine rotavirus.
Infect. Immun. 35:1058 (1982)

(23) Büttner R. Untersuchungen zur elektrophoretischen Differenzierung des Genoms humaner Rotaviren.
Dissertation an der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München (1985).

- (24) Chiba Y, Miyazaki C, Makino Y, Mutanda LN, Kibue A, Lidenga EO, and Tukei PM. Rotavirus infection of young children in two districts of Kenya between 1982 to 1983, as analyzed by electrophoresis of genomic RNA.
J. Clin. Microbiol. 19:579 (1984)
- (25) Chrystie IL, Totterdell BM, and Banatvala JE. False positive Rotazyme test on fecal samples from babies.
Lancet 2:1028 (1983)
- (26) Clark SM, Barnett BB, and Spendlove RS. Production of high titer bovine rotavirus with trypsin.
J. Clin. Microbiol. 9:413 (1979)
- (27) Clark SM, Spendlove RS, and Barnett BB. Role of two particle types in bovine rotavirus morphogenesis.
J. Virol. 34:272 (1980)
- (28) Clark SM, Roth RB, Clark ML, Barnett BB, and Spendlove RS. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: Mechanisms of enhancement.
J. Virol. 39:816 (1981)
- (29) Cohen J. Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus
J. Gen. Virol. 36:395 (1977)
- (30) Davidson GP, Bishop RF, Townley RRW, Holmes IH, and Ruck BJ. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children.
Lancet 1:242 (1975)
- (31) Davidson GP, Gall DG, Petric M, Butler DG, and Hamilton JR. Human Rotavirus enteritis induced in conventional piglets.
J. Clin. Invest. 60:1402 (1977)

- (32) Davidson GP and Barnes GL. Structural and functional abnormalities of the small intestine in infants and young children with rotavirus enteritis.
Acta Paediatr. Scand. 68:181 (1979)
- (33) Dimitrov DH, Estes MK, Rangelova SM, Shindarov LM, Melnick JL, and Graham DY. Detection of antigenically distinct rotaviruses from infants.
Infect. Immun. 41:523 (1983)
- (34) Dolan AT, Twist EM, Horton-Slight P, Forrer C, Bell LM, Plotkin SA, and Clark FH. Epidemiology of rotavirus electrophoretotypes determined by a simplified diagnostic technique with RNA analysis.
J. Clin. Microbiol. 21:753 (1985)
- (35) Eiden J, Vonderfecht S, and Yolken RH. Evidence that a novel rotavirus-like agent of rats can cause gastroenteritis in man.
Lancet 2:8 (1985)
- (36) Espejo RT, Calderon E, and Gonzales N. Distinct reovirus-like agents associated with acute infantile gastroenteritis.
J. Clin. Microbiol. 6:502 (1977)
- (37) Espejo RT, Munoz O, Serafin F, and Romero P. Shift in the prevalent human rotavirus detected by ribonucleic acid segment differences.
Infect. Immun. 27:351 (1980)
- (38) Espejo RT, Avenado LF, Munoz O, Romero P, Eternod JG, Lopez S, and Moncaya J. Comparison of human rotavirus isolated in Mexico City and in Santiago, Chile, by electrophoretic migration of their double stranded RNA-genome segments.
Infect. Immun. 30:342 (1980)

- (39) Espejo RT, Lopez S, and Arias C. Structural polypeptides of simian rotavirus SA-11 and the effect of trypsin.
J. Virol. 37:156 (1981)
- (40) Espejo RT, Puerto F, Soler C, and Gonzales N. Characterization of a human pararotavirus.
Infect. Immun. 44:112 (1984)
- (41) Estes MK, Graham DY, and Mason BB. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: Molecular mechanisms.
J. Virol. 39:879 (1981)
- (42) Fernelius AL, Ritchie AE, Classick KLG, Norman JO, and Mebus CA. Cell culture adaptation and propagation of a reovirus-like agent of calf diarrhea from a field outbreak in Nebraska.
Arch. Ges. Virusforsch. 37:114 (1972)
- (43) Fields BN and Joklik WK. Isolation and preliminary genetic and biochemical characterization of temperature-sensitive mutants of reovirus.
Virology 37:335 (1969)
- (44) Fields BN. Genetic manipulation of reovirus - a model for modification of disease?
N. Engl. J. Med. 287:1026 (1972)
- (45) Flewett TH, Bryden AS, and Davies H. Virusparticles in gastroenteritis.
Lancet 2:497 (1973)
- (46) Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Bridger JC, and Derrick JM. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves.
Lancet 2:61 (1974)

- (47) Flewett TH, Bryden AS, and Davies H. Epidemic viral enteritis in a long stay children's ward.
Lancet 1:4 (1975)
- (48) Flewett TH and Woode GN. The rotaviruses. Brief review.
Arch. Virol. 57:1 (1978)
- (49) Follet EAC and Desselberger U. Cocirculation of different rotavirus strains in a local outbreak of infantile gastroenteritis: Monitoring by rapid and sensitive nucleic acid analysis.
J. Med. Virol. 11:39 (1983)
- (50) Follet EAC, Sanders RC, Beards GM, Hundley F, and Desselberger U. Molecular epidemiology of human rotavirus. Analysis of outbreaks of acute gastroenteritis in Glasgow and the west of Scotland 1981/82 and 1982/83.
J. Hyg. Camb. 92:209 (1984)
- (51) Garbarg-Chenon A, Bricout F, and Nicolas JC. Study of genetic reassortment between two human rotaviruses.
Virology 139:358 (1984)
- (52) Ginsberg HS, Gold E, and Jordan WS Jr. Tryptose Phosphat Broth as supplementary factor for maintenance of HeLa cell tissue cultures. (21718)
Proc. Soc. Exp. Biol&Med. 89:66 (1955)
- (53) Goldwater PN, Chrystie IL, and Banatvala JE. Rotavirus and the respiratory tract.
Br. Med. J. 4:1551 (1979)
- (54) Graham DY and Estes MK. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity : Biologic mechanisms.
Virology 101:432 (1980)

- (55) Greenberg HB, Kalica AR, Wyatt RG, Jones RW, Kapikian AZ, and Chanock RM. Rescue of noncultivable human rotavirus by gene reassortment during mixed infection with ts-mutants of a cultivable bovine rotavirus.
Proc. Natl. Acad. Sci. 78:420 (1981)
- (56) Greenberg HB, Wyatt RG, Kapikian AZ, Kalica AR, Flores J, and Jones R. Rescue and serotypic characterization of non-cultivable human rotavirus by gene reassortment.
Infect. Immun. 37:104 (1982)
- (57) Greenberg HB, McAuliffe T, Valdesuso J, Wyatt RG, Flores J, Kalica AR, Hoshino Y, and Singh N. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies.
Infect. Immun. 39:91 (1983)
- (58) Grunow JE, Denton SF, and Warner JL. Human rotavirus-like particles in a hepatic abscess.
J. Pediatr. 106:73 (1985)
- (59) Hardy A and Watt J. Studies of the acute diarrheal diseases.
XVIII Epidemiol. Public Health Rep. 63:363 (1948)
- (60) Hasegawa A, Matsuno S, Inouye S, Kono R, Tsurukubo Y, Mukoyama A, and Saito Y. Isolation of human rotavirus in primary cultures of monkey kidney cells.
J. Clin. Microbiol. 16:387 (1982)
- (61) Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgras DR, and Menzies JD. Rapid diagnosis of rotaviral infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyarylamide gels.
J. Clin. Microbiol. 16:473 (1982)

- (62) Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nicol S, and Vandepol S. Rapid evaluation of RNA genomes.
Science 215:1577 (1982)
- (63) Holmes IH. Rotaviruses, in: The reoviridae, (p.359-423),
edt. by Joklik WK. Plenum Press New York and London (1983)
- (64) Houly C, Grunert B, Werchau H, Mietens C, Brüssow W, and Hilpert H. Epidemiology of rotavirus gastroenteritis in infants from the area of Bochum as revealed by electrophoresis of genome RNA.
Eur. J. Pediatr. 143:128 (1984)
- (65) Hruska JF, Notter MD, Manegus MA, and Steinhoff MC. RNA-polymerase associated with human rotaviruses in diarrheal stools.
J. Virol. 26:544 (1978)
- (66) Hung T, Wang C, Fang Z, Chou Z, Chang X, Liang X, Chen G, Yoro H, Chao T, Ye W, Den S, and Chang W. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhea in adults in China caused by a novel rotavirus.
Lancet 1:1139 (1984)
- (67) Kalica AR, Garon CF, Wyatt RG, Mebus CA, van Kirk DH, Chanock RM, and Kapikian AZ. Differentiation of human and calf reovirus-like agents associated with diarrhea using polyacryamide gel electrophoresis of RNA
Virology 74:86 (1976)
- (68) Kalica AR, Sereno MM, Wyatt RG, Mebus CA, Chanock RM, and Kapikian AZ. Comparison of human and animal rotavirus strains by gel electrophoresis of viral RNA
Virology 87:247 (1978)

- (69) Kalica AR, Grennberg HB, Wyatt RG, Flores J, Sereno MM, Kapikian AZ, and Chanock RM. Genes of human strain (Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens.
Virology 112:385 (1981)
- (70) Kalica AR, Greenberg HB, Espejo RT, Flores J, Wyatt RG, Kapikian AZ, and Chanock RM. Distinct ribonucleic acid pattern of human rotavirus subgroups 1 and 2.
Infect. Immun. 33:958 (1981)
- (71) Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, Rodriguez WJ, Ross S, Cline WL, Parrot RH, and Chanock RM. Reovirus-like agent in stools: Association with infantile diarrhea and development of serologic tests.
Science 185:1049 (1974)
- (72) Kapikian AZ, Kalica AR, Shih JW, Cline WL, Thornhill TS, Wyatt RG, Chanock RM, Kim HW, and Gerin IL. Buoyant density in caesium chloride of the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis by ultracentrifugation, electron microscopy and complement fixation.
Virology 70:564 (1976)
- (73) Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, Cline WL, Arrobbio JO, Brandt CD, Rodriguez WJ, Sack DA, Chanoch RM, and Parrot RH. Human reovirus-like agent (HRVLA) as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children.
N. Engl. J. Med. 294:965 (1976)
- (74) Kim HW, Brandt CD, and Kapikian AZ. Human reovirus-like agent (HRVLA) infection. Occurrence in adult contacts of pediatric patients with gastroenteritis.
J. A. M. A. 238:404 (1977)

- (75) Kutsusawa T, Konno T, Suzuki H, Kapikian AZ, Ebina T, and Ishida N. Isolation of human rotavirus suggroups 1 and 2 in cell culture.
J. Clin. Microbiol. 16:727 (1982)
- (76) Kutsusawa T, Konno T, Suzuki H, Ebina T, and Ishida N. Two distinct electrophoretic patterns of RNA segments of human rotavirus prevalent in Japan in relation to their serotypes.
Microbiol. Immunol. 26:271 (1982)
- (77) Lewis HM, Parry JV, Davies HA, Parry RP, Mott A, Dour-mashkin RR, Sanderson PJ, Tyrrell DAJ, and Valman HB. A year's experience of the rotavirus syndrome and its association with respiratory illness.
Arch. Dis. Child. 54:339 (1979)
- (78) L'Harridon R, and Scherrer R. Culture in vitro in rotavirus associe aux diarrhes neonatales du reau.
Ann. Rech. Vet. 7:373 (1977)
- (79) Ligh LS and Hodes JH. Studies on epidemic diarrhea of the newborn: Isolation of a filtratable agent causing diarrhea in calves.
Am. J. Publ. Health. 33:1451 (1943)
- (80) Lourenco MH, Nicolas JC, Cohen J, Scherrer R, and Bricout F. Study of human rotavirus genome by electrophoresis: Attempt of classification among strains isolated in France.
Ann. Virol. (Inst. Pasteur) 132 E :161 (1981)
- (81) Mahy BWJ. Strategies of virus persistence.
Br. Med. Bull. 41:50 (1985)
- (82) Malherbe HH and Strickland-Cholmley M. Simian virus SA-11 and related O'agent.

- (83) Matsuno S, Inouye S, and Kono R. Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody in human sera.
J. Clin. Microbiol. 5:1 (1977)
- (84) Matsuno S, Hasegawa A, Kalica AR, and Kono R. Isolation of a recombinant between simian and bovine rotavirus.
J. Gen. Virol. 48:253 (1980)
- (85) Matsuno S, Utagawa E, and Sugiura A. Association of rotavirus infection with Kawasaki-syndrome.
J. Infect. Dis. 148:177 (1983)
- (86) Matthews REF. The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in The Hague, in September 1978
Intervirology 11:133 (1979)
- (87) McKimm-Breschkin IL and Holmes IH. Conditions required for introduction of interferon / rotaviruses and their sensitivity to its action.
Infect. Immun. 36:857 (1982)
- (88) McNulty MS, Allan GM, and McFerran JB. Isolation of a cytopathic calf rotavirus.
Res. Vet. Sci. 21:114 (1976)
- (89) McNulty MS, ALLan GM, Pearson GR, McFerran JB, Curran WL, and McCracken RM. Reovirus-like agent (rotavirus) from lambs.
Infect. Immun. 14:1332 (1976)
- (90) McNulty MS. Rotaviruses (A review)

- (91) McNulty MS, Curran WL, Allan GM, and McFerran JB. Synthesis of coreless probably defective virusparticles in cell cultures infected with rotaviruses.
Arch. Virol. 58:193 (1978)
- (92) McNulty MS, Allan GM, Todd D, and McFerran JB. Isolation and cell culture propagation of rotaviruses from turkeys and chickens
Arch. Virol. 61:13 (1979)
- (93) McNulty MS, Allan GM, Todd D, McFerran JB, and McCracken RM. Isolation from chickens of rotavirus lacking the rotavirus group antigen.
J. Gen. Virol. 55:405 (1981)
- (94) Mebus CA, Kono M, Underdahl NR, and Twiehaus MJ. Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus.
Can. Vet. J. 12:69 (1971)
- (95) Mebus CA, Wyatt RG, Harpee RL, Sereno MM, Kalica AR, Kapikian AZ, and Twiehaus MJ. Diarrhea in gnotobiotic calves caused by the reovirus-like agent of human infantile gastroenteritis.
Infect. Immun. 14:471 (1976)
- (96) Middleton PJ, Szymanski MT, Abbott GD, Bartolussi R, and Hamilton JR. Orbivirus acute gastroenteritis of infancy
Lancet 1:1241 (1974)
- (97) Morinet F, Ferchal F, Calimon R, and Pirol Y. Comparison of six methods for detection human rotavirus in stools.
Eur. J. Clin. Microbiol. 3:136 (1984)

- (98) Naguib T, Wyatt RG, Mohieldin MS, Zaki AM, Imam ZI, and DuPont HL. Cultivation and subgroup determination of human rotaviruses from Egyptian infants and young children. *J. Clin. Microbiol.* 19:210 (1984)
- (99) Newman JFE, Brown F, Bridger JC, and Woode GN. Characterization of rotavirus *Nature* 258:631 (1975)
- (100) Nicolas JC, Cohen J, Fortier B, Lourenco MH, and Bricout F. Isolation of an human pararotavirus *Virology* 124:181 (1983)
- (101) Nicolas JC, Portier P, Cohen J, Lourenco MH, Thompson R, Guimbaud P, Chenon A, Dauvergne M, and Bricout F. Survey of human rotavirus propagation as studied by electrophoresis of genomic RNA. *J. Infect. Dis.* 149:688 (1984)
- (102) Offit PA, Clark HF, Stroop WG, Twist EM, and Plotkin SA. The cultivation of human rotavirus strain Wa to high titer in cell culture and characterization of the viral structural polypeptides. *J. Virol. Meth.* 7:29 (1983)
- (103) Palmer EL, Martin ML, and Murphy FA. Morphology and stability of infantile gastroenteritis virus: Comparison with reovirus and bluetongue virus. *J. Gen. Virol.* 35:403 (1977)
- (104) Peakock S and Dingman CW. Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. *Biochem* 7:668 (1968)
- (105) Pedley S, Bridger JC, Brown JF, and McGrae MA. Molecular

characterization of rotavirus with distinct group antigens.
J. Gen. Virol. 64:2093 (1983)

- (106) Perez-Schael I, Daoud G, White L, Urbina G, Daoud F, Perez M, and Flores J. Rotavirus shedding in newborn children
J. Med. Virol. 14:127 (1984)
- (107) Petric M, Szymanski MT, and Middleton PJ. Purification and preliminary characterization of infantile gastroenteritis virus (orbivirus group).
Intervirology 5:233 (1975)
- (108) Portnoy R, DuPont H, and Pruitt D. Antidiarrheal agents in the treatment of acute diarrhea in children.
J. A. M.A. 236:844 (1976)
- (109) Purdham DR, Purdham PA, Evans N, and McNeish AS. Isolation of human rotavirus using human embryonic gut monolayers.
Lancet 2:977 (1975)
- (110) Quan CM and Doane FW. Ultrastructural evidence for the cellular uptake of rotavirus by endocytosis.
Intervirology 20:223 (1983)
- (111) Ramig RF and Petrie BL. Characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA-11: Proteinsynthesis and morphogenesis
J. Virol. 49:665 (1984)
- (112) Rodger SM, Schnagl RD, and Holmes IH. Biochemical and biophysical characterization of diarrhea viruses of human and calf origin.
J. Virol. 16:1229 (1975)
- (113) Rodger SM and Holmes IH. Comparison of the genome of simian, bovine and human rotavirus by gelelctrophoresis and

detection of genomic variation among bovine isolates.
J. Virol. 30:839 (1979)

- (114) Rodger SM, Bishop RF, Birch C, McLean B, and Holmes IH. Molecular epidemiology of human rotavirus in Melbourne/Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome RNA.
J. Clin. Microbiol. 13:273 (1981)
- (115) Rodger SM, Bishop RF, and Holmes IH. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant.
J. Clin. Microbiol. 16:724 (1982)
- (116) Rodriguez WJ, Kim HW, Brandt CD, Gardner MK, and Parrot RH. Use of electrophoresis of RNA from human rotavirus to establish the identity of strains involved in outbreaks in a tertiary care nursery.
J. Infect. Dis. 148:34 (1983)
- (117) Rubinstein AS and Miller MF. Comparison of an enzyme immunoassay with electron microscopic procedures for detecting rotavirus.
J. Clin. Microbiol. 15:938 (1982)
- (118) Saitho Y, Matsuno S, and Mukoyama A. Exanthema subitum and rotavirus.
N. Engl. J. Med. 304:845 (1981)
- (119) Salmi TT, Arstila P, and Koivikko A. Central Nervous system involvement in particles with rotavirus gastroenteritis.
Scand. J. Infect. Dis. 10:29 (1978)
- (120) Sammons DW, Adams LD, and Nishizawa EE. Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels.
Electrophoresis 2:135 (1981)

- (121) Sanders RC, Beards GM, and Flewett TH. A Shift in prevalent human rotavirus strains
Com. Dis. Rep. 83/14 p.3 (1983)
- (122) Sato K, Inaba Y, Shinozaki T, Fujii R, and Matumoto M. Isolation of human rotavirus in cell cultures.
Arch. Virol. 69:155 (1981)
- (123) Saulsbury F, Winkelstein J, and Yolken RH. Chronic rotavirus infection in children with immunodeficiency diseases.
J. Pediatr. 97:61 (1980)
- (124) Schnagl RD, Rodger SM, and Holmes IH. Variation in human rotavirus electropherotypes occurring between rotavirus gastroenteritis epidemics in Central Australia.
Infect. Immun. 33:17 (1981)
- (125) Shiga K. Observations on the epidemiology of dysentery in Japan.
Philippine J. Sci. 1:485 (1905)
- (126) Silverstein SC, Christman JK, and Acs G. The reovirus replicative cycle.
Annu. Rev. Biochem. 45:375 (1976)
- (127) Snodgras RS, Herring AJ, Campell I, Inglis JM, and Hargreaves FD. Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs and man.
J. Gen. Virol. 65:909 (1984)
- (128) Soenarto Y, Sebodo T, Ridho R, Alrasjih H, Rhock JE, Bugg H, Barnes GL, and Bishop RF. Acute diarrhea and rotavirus infection in newborn babies and children in Yogyakarta, Indonesia, from June 1978 to June 1979.
J. Clin. Microbiol. 14:123 (1981)

- (129) Spence E and Arias M. In vitro transscption catalyzed by heat-treated human rotavirus.
J. Virol. 40:1 (1981)
- (130) Spencer EG, Avendano LF, Araya M. Characteristicts and analysis of electropherotypes of human rotavirus isolated in Chile.
J. Infect. Dis. 148:41 (1983)
- (131) Spencer EG, Avendano LF, and Garcia BI. Analysis of human rotavirus mixed electropherotypes.
Infect. Immun. 37:104 (1983)
- (132) Streissle G. Persistant viral infections as model for re-search in virus chemotherapy.
Adv. Virus Res. 26:37 (1981)
- (133) Suzuki H, Konno T, Kitaoka S, Sato T, Ebina T, and Ishida N. Further observations on the genesis of human rotavirus in Ma 104 cells.
Arch. Virol. 79:147 (1984)
- (134) Suzuki H, Kitaoka S, Konno T, Sato T, and Ishida N. Two modes of human rotavirus entry into Ma 104 cells.
Arch. Virol. 85:25 (1985)
- (135) Taylor PR, Merson MH, Black RE, Mizanur-Ralman ASM, Yunus MD, Arma A, and Yolken RH. Oral rehydratation therapy for treatment of rotavirus diarrhea in a rural treatment centre in Bangladesh.
Arch. Dis. Child. 55:376 (1979)
- (136) Theil KW, Bohl EH, and Agnes AG. Cell culture propagation of porcine rotavirus (reovirus-like agent)
Am. J. Vet. Res. 38:1765 (1977)

- (137) Theil KW, McCloskey CM, Saif LJ, Redman DR, Bohl EH, Hankock DD, Kohler EM, and Moorhead PD. Rapid, simple method of preparing rotaviral double stranded ribonucleic acid for rotaviral infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels.
J. Clin. Microbiol. 16:473 (1982)
- (138) Todd D and McNulty MS. Characterization of pig rotavirus RNA.
J. Gen. Virol. 33:147 (1976)
- (139) Ushijima H, Kim B, Tajima T, Araki K, Yoshino K, Shinozaki T, and Fujii R. Epidemiology of rotavirus infection in Tokyo during two winter seasons, as revealed by analysis of recovered RNA.
Eur. J. Pediatr. 142:71 (1984)
- (140) Urasawa T, Urasawa S, and Tanigushi K. Sequential passages of human rotavirus in Ma 104 cells.
Microbiol. Immunol. 25:1025 (1981)
- (141) Vesikari T, Isolauri E, Delem A, D'Horrdt E, Andre FE, and Zissis G. Immunogenicity and safety of live oral attenuated bovine rotavirus vaccine strain RIT 4237 in adults and young children.
Lancet 2:807 (1983)
- (142) Ward RL, Knowlton DR, and Pierce MJ. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture.
J. Clin. Microbiol. 19:748 (1984)
- (143) White RL, Perez I, Perez M, Urbina G, Greenberg HB, Kapi-kian AZ, and Flores J. Relative frequency of rotavirus subgroup 1 and 2 in Venezuelan children with gastroenteritis as assayed with monoclonal antibodies.
J. Clin. Microbiol. 19:516 (1984)

- (144) Wyatt RG, Gill VW, Sereno MM, Kalica AR, van Kirk DH, Chanock RM, and Kapikian AZ. Probable in vitro cultivation of human reovirus-like agent of infantile diarrhea. Lancet 1:98 (1976)
- (145) Wyatt RG, James WD, Bohl EH, Theil KW, Saif LJ, Kalica AR, Greenberg HB, Kapikian AZ, and Chanock RM. Human rotavirus type 2: Cultivation in vitro. Science 207:189 (1980)
- (146) Wyatt RG, James HD Jr, Pittman AL, Hoshino Y, Greenberg HB, Kalica AR, Flores J, and Kapikian AZ. Direkt isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. J. Clin. Microbiol. 18:310 (1983)
- (147) Yolken RH, Wyatt RG, Zissis G, Brandt CD, Rodriguez WJ, Kim HW, Parrot RH, Urrutia JJ, Mata L, Greenberg HB, Kapikian AZ, and Chanock RM. Epidemiology of human rotavirus types 1 and 2 as studied by enzyme-linked immunosorbent assay. N. Engl. J. Med. 299:1156 (1978)
- (148) Yolken RH and Murphy M. Sudden infant death syndrome associated with rotavirus infection. J. Med. Virol. 10:291 (1982)
- (149) Yolken RH. Rotavirus and other viruses causing gastroenteritis. In, Belshe RB (ed.): Textbook of human virology (p.795). PSG, Littleton (1984)

7. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Frösner bin ich zu großem Dank für die Vergabe des Themas und die hilfreiche Betreuung bei der Bearbeitung verpflichtet.

Mein Dank gilt des weiteren Herrn Prof. Dr. Bachmann und seiner Arbeitsgruppe (Mikrobiologisches Institut der tiermedizinischen Fakultät der Universität München), insbesondere den Herrn Dr. Hess und Dr. Eichorn für die Bereitstellung der Gewebekulturzellen und die freundliche Unterstützung.

Besonders Herrn Prof. Dr. Valet und seinem Team (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried) bin ich für die freundliche Bereitstellung des Schreibcomputers dankbar.

Ebenso danke ich Frl. B. Hottenträger für ihre Unterstützung bei den zahlreichen ELISA-Testen, Frl. M. Schall für die Einweisung in die Gewebekultur und Frl. H. Schmidt für die photographische Dokumentation.

LEBENS LAUF

Geboren am zweiten November 1959 in Reutlingen als Sohn von Wolfgang und Bärbel Deutscher.

Die Einschulung erfolgte 1966 in der Grundschule Berlin/Wannsee. 1970 Übertritt an das Theresiengymnasium München.

1979 Abitur in den Fächern Biologie/Chemie, Griechisch, Geschichte und Kunst. Das Thema der Facharbeit war die abiogene Aminosäuresynthese.

Von Juli 1979 bis Dezember 1979 Tätigkeit als Laborant in der virologischen Abteilung des Max von Pettenkofer Institutes.

Danach Ableistung von zehn Monaten Grundwehrdienst bei der Bundeswehr.

Beginn des vorklinischen Studiums der Medizin im WS 1980/81 an der Universität Regensburg mit Abschluß der ärztlichen Vorprüfung im August 1982.

Beginn des klinischen Studiums an der LMU München im WS 1982/83. Erstes Staatsexamen im August 1983 abgelegt. Zweites Staatsexamen im August 1985 mit der Note 2 bestanden.

Danach Studium im praktischen Jahr an der I. Med. Klinik (Universitätsklinikum Grosshadern), Städt. Krhs. M-Neuperlach und an der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Kranke (Universitätsklinikum Grosshadern).

Drittes Staatsexamen im Dezember 1986 schriftlich und mündlich mit der Note 1 bestanden.

Seit 1983 als studentische Hilfskraft an der Hals-Nasen-Ohrenklinik Grosshadern unter der Leitung von Herrn PD Dr. Wustrow tätig.

